

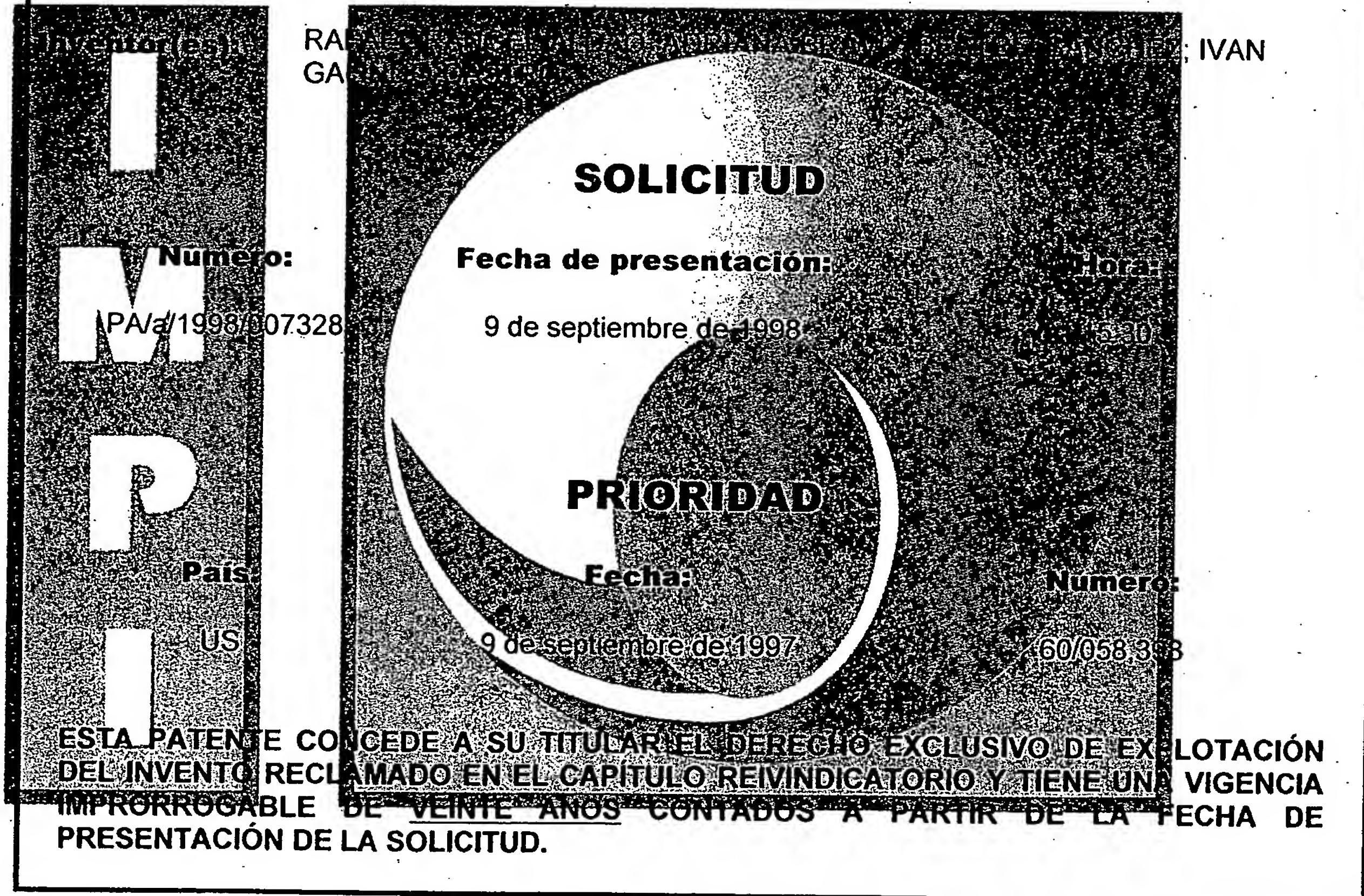
TÍTULO DE PATENTE NO. 220173

Titular(es): RAFAEL RANGEL-ALDAO; ADRIANA BRAVO; BEATRIZ SÁNCHEZ; IVAN GALINDO-CASTRO.

Domicilio(s): Avenida Este 3, Residencias El Portal, Apto. 8B, Urb. Los Naranjos, Caracas, VENEZUELA

Denominación: BEBIDA DE MALTA QUE TIENE SABOR ESTABILIZADO Y METODOS PARA LA PRODUCCION DE LA MISMA.

Clasificación: Int.Cl.6: C12C11/00; C12C5/02; C12H1/00; C12N15/52



Fecha de expedición: 28 de abril de 2004

EL DIRECTOR DIVISIONAL DE PATENTES


QUIM. FABIAN R. SALAZAR GARCIA



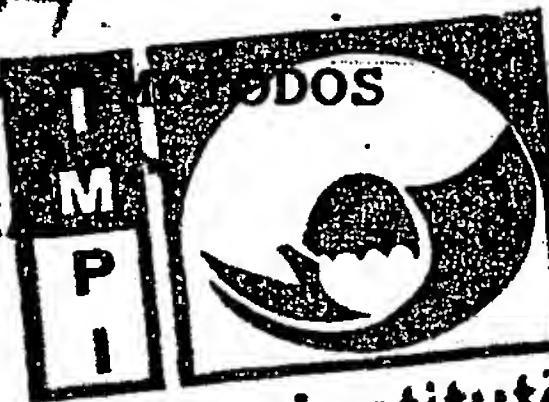
98.2328

2201-3
28/04/04

1 BEBIDA DE MALTA QUE TIENE SABOR ESTABILIZADO

PARA LA PRODUCCION DE LA MISMA

ANTECEDENTES DE LA INVENCION



Instituto
Mexicano

de la Propiedad
Industrial

Campo de la invención.

5 La presente invención se relaciona con el ~~de la~~ campo de la biotecnología y de la manufactura de alimentos/bebidas. La invención se relaciona con la producción de bebidas de malta y, más particularmente, con la producción de bebidas de malta que tienen estabilidad del sabor mejorada. En 10 particular, la invención se relaciona con métodos y composiciones para mejorar la estabilidad del sabor de las bebidas fermentadas de malta tales como cerveza, y con las bebidas de malta que se producen por estos métodos.

15 **Técnica relacionada.**

El Proceso de Producción de Cerveza.

Resumen. En la producción de las bebidas fermentadas de malta, como la cerveza, un extracto con agua caliente de malta de cebada, con o sin otros granos no malteados, como el arroz o el maíz, es hervido con lúpulo, se enfria y se somete a la acción fermentativa de la levadura. El agua caliente que se utiliza para extraer la malta permite que la acción de diversas enzimas de la malta hidrolicen el almidón en la cebada (y en el maíz o arroz) hasta azúcar fermentable, sobre el cual actúa la levadura para producir el alcohol en la bebida fermentada de malta.

Malteo. La cebada malterá se remoja en agua para producir la cebada remojada que se germina a una temperatura muy baja. La germinación se efectúa con un mezclado diario y adición de agua según sea necesario para mantener el contenido de humedad aproximadamente a 43%. La malta verde resultante contiene un alto contenido de precursores del sabor de la cerveza, componentes del sabor de la cerveza, y colorantes. Luego de completarse la germinación, la malta verde se calienta con un elevado contenido de humedad para generar los precursores del sabor de la cerveza, los componentes del sabor de la cerveza y también para reducir la actividad enzimática amilolítica. Despues del calentamiento, la malta se seca hasta un contenido de humedad de 3.5-5.5% y un contenido de proteína soluble de 6.5-8%. La malta secada puede entonces macerarse para producir un mosto que se somete a ebullición con lúpulo, se enfria, se inocula con levadura de cerveza y es procesado mediante procedimientos convencionales de fabricación de la cerveza y en equipo convencional de fabricación de la cerveza.

Macerado. La malta, que realmente puede ser una mezcla de maltas (i.e., malta cervecería estándar, malta con color elevado y bajo contenido de amilasa, etc.), es molida y mezclada con una cantidad 2.5 a 4 veces su peso, de agua caliente, en grandes ollas y se macera a una temperatura de 35-40°C durante 5 a 15 minutos hasta que forme un macerado

espeso de malta. El macerado entonces se calienta durante 45-90 minutos, sin agitación, luego se calienta en etapas hasta una temperatura de 70-73°C, mientras se agita, dando tiempo en cada etapa para que las diversas enzimas conviertan los almidones en azúcares fermentables. ^{después} 5 del calentamiento, el macerado es retenido durante 15-30 minutos, la temperatura se incrementa a 75°C, y el macerado es transferido hacia la unidad Lauter (Filtro Lauter).

Si se van a utilizar adjuntos de arroz o de maíz, se cuecen separadamente y se obtiene un macerado del cocedor.

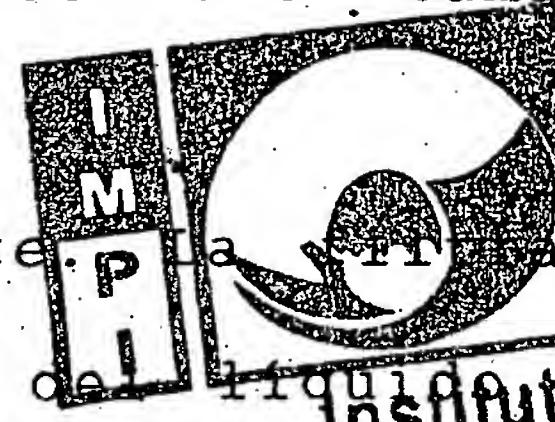
La producción del macerado del cocedor involucra el uso de adjuntos junto con una porción del 10% al 30% de la malta (o la adición de enzimas comerciales) con el fin de convertir el almidón de las materias primas en azúcares fermentables. Los adjuntos y la porción de malta se llevan gradualmente a ebullición y se mantienen así hasta que los productos se gelatinicen completamente. Durante las etapas finales del macerado (a las temperaturas más altas), se combinan el macerado del cocedor y el macerado de malta.

20 El macerado tiene un triple propósito. Primero, disuelve las sustancias de la malta (y adjuntos) que son fácilmente solubles en agua caliente. Segundo, permite que las enzimas de la malta actúen sobre las sustancias insolubles y las conviertan en solubles. Tercero, 25 proporciona una degradación enzimática completa de los



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

almidones, proteínas y gomas en productos de menor tamaño y menor peso molecular.



Filtrado y Rociado con agua Caliente. La filtración ("Lautering") consiste en la eliminación del líquido que ahora se llama "mosto", de las cascarillas de los trigo o "granos gastados". La filtración ("Lautering") se realiza al final del proceso de macerado, con lo cual el macerado terminado se transfiere hacia el filtro Lauter. Allí, se le permite descansar durante aproximadamente diez a treinta minutos, tiempo durante el cual los granos gastados se sedimentan en el fondo. El filtro lauter está equipado con un fondo falso que contiene numerosas perforaciones y una salida que conduce al verdadero fondo del filtro. El macerado se deja, entonces, sedimentar durante 10-20 minutos y se inicia la corrida. El mosto se recicla hasta que se encuentra razonablemente claro. El mosto claro se bombea entonces a una olla de cocción. Se hace correr agua caliente a través de los granos gastados para enjuagar, o rociar, cualquier mosto remanente.

La temperatura del filtro lauter es de aproximadamente 72-77°C, tanto para el agua del baño como el agua de rociado. La cantidad de agua de rociado utilizada es de aproximadamente 50%-75% de la cantidad del agua para la elaboración de la cerveza.

Ebullición y Lupulado del Mosto: Fermentación Primaria.

El mosto se somete a ebullición vigorosa durante una y dos

horas y media en la olla de cocimiento. El lúpulo (o extractos del mismo) puede ser adicionado en diversas etapas del proceso de ebullición, dependiendo de la naturaleza del producto final que se busca.



La ebullición del mosto tiene diversos objetivos, incluyendo (1) concentración del mosto (2) inactivación completa de las enzimas que pueden haber sobrevivido al proceso final de macerado, (3) coagulación y precipitación de las proteínas de alto peso molecular y de los sólidos (denominado "rompimiento de la olla" o "rompimiento en caliente"), (4) extracción de los constituyentes deseables del lúpulo, y (5) esterilización del mosto.

Enfriamiento, Fermentación y Almacenamiento:

Maduración. Despues de la ebullición, el mosto se filtra para eliminar los sólidos o "trub", y el mosto se enfría, entonces, hasta una temperatura de aproximadamente 12-16°C.

La fermentación se inicia con la cantidad adecuada de un cultivo puro de levadura de cerveza (típicamente aproximadamente 0.7-1.5 lb/bbl). Despues de 24 horas, la fermentación queda establecida y procede a una velocidad acelerada. La fermentación típicamente procede durante aproximadamente 7 a 10 días. Durante este periodo, la temperatura del mosto debe ser controlada, debido a que el proceso de fermentación origina que la temperatura del mosto se incremente. Una vez que la levadura ha

metabolizado todos los ingredientes fermentables en el mosto, se sedimenta en el fondo y posteriormente se recupera y se recicla para volver a las fermentaciones. A medida que concluye la fermentación, la 5 temperatura del mosto empieza a caer. El mosto (denominado "cerveza verde") es extraído para su almacenamiento en un tanque de un cuarto frío, o "ruh", donde su temperatura se reduce hasta aproximadamente 0-5°C.

Procesamiento y empacado. La cerveza "ruh" puede 10 dejarse en el tanque de "ruh" hasta completar el proceso de maduración, o puede ser transferida a un tanque de maduración separado, después de cualquier sedimentación adicional de la levadura y diversos sólidos remanentes. Dependiendo de la cervecería particular, la cerveza se deja 15 madurar desde aproximadamente 14 días hasta aproximadamente 3 meses. Durante este periodo, la cerveza se clarifica y se desarrolla su sabor. Después de la maduración, la cerveza generalmente se filtra para eliminar la levadura y otros sólidos.

20 La cerveza puede someterse a un proceso de filtración de un solo paso o de doble paso. La filtración de doble paso consiste de dos etapas: una filtración primaria (gruesa), y una filtración secundaria (fina). La cerveza filtrada se almacena posteriormente en un tanque de 25 terminación.





Instituto
Mexicano

de la Propiedad

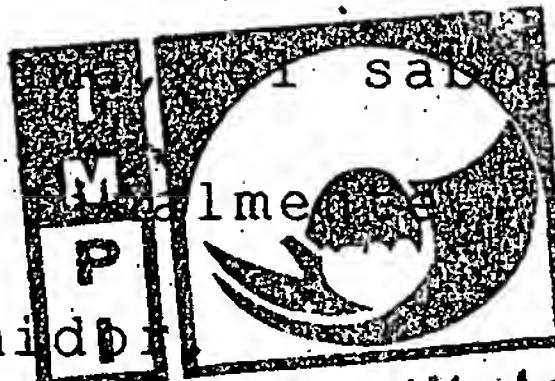
Intelectual

Para preparar la cerveza para su consumo, se carbonata hasta un nivel específico. Entonces, dependiendo de la forma de envasado, la cerveza puede pasteurizarse. En el caso de las cervezas de barril ("draft") filtradas en el Instituto, se utiliza un sistema de microfiltración para eliminar los contaminantes, obviando, por consiguiente, la industria de pasteurización). La cerveza envasada en latas y botellas generalmente se pasteuriza, mientras que la cerveza envasada en barriles pequeños (y algunas veces en botellas) permanece sin pasteurizar. Después del procesamiento final del producto empacado (e.g., rotulado, etc.), la cerveza se encuentra lista para su embarque hacia el consumidor.

Otras etapas de procesamiento convencionales, conocidas por aquellos entrenados en la técnica, pueden ser utilizadas en lugar de, o además de, los métodos de producción de cerveza, generales, discutidos anteriormente. Por ejemplo, el mosto fermentado puede ser diluido con agua para producir una bebida no alcohólica, de malta, con bajas calorías (40 calorías o menos, por 12 onzas (350 ml)) (menos de 0.5 por ciento de alcohol en volumen), que simula muy bien el sabor, gusto y sensación en la boca de la cerveza convencional.

Los Atributos de las Bebidas Fermentadas de Malta.

Las bebidas de malta, especialmente la cerveza, posee atributos que pueden diferenciarse fácilmente por el

consumidor. Estos atributos incluyen la espuma, el sabor y la claridad. De éstos, el sabor es,  la característica más importante para el consumidor.

El sabor (pureza) y el sabor residual (sensación refrescante) son medidas típicamente en la industria dentro de la **Propiedad Industrial**.

de cualquiera de los siguientes cinco grados:

1: El sabor no es muy limpio y el sabor residual no tiene la sensación refrescante.

2: El sabor no es limpio y el sabor residual casi no tiene sensación refrescante.

3: Usual.

4: El sabor es limpio y el sabor residual tiene la sensación refrescante.

5: El sabor es muy limpio y el sabor residual tiene una sensación muy refrescante.

La estabilidad del sabor se evalúa típicamente en el producto envasado almacenado (usualmente a una temperatura de almacenamiento de 28°C durante 15 días) típicamente dentro de las cinco escalas siguientes:

1: Significativamente echado a perder.

2: Echado a perder (descompuesto).

3: Usual.

4: Fresco.

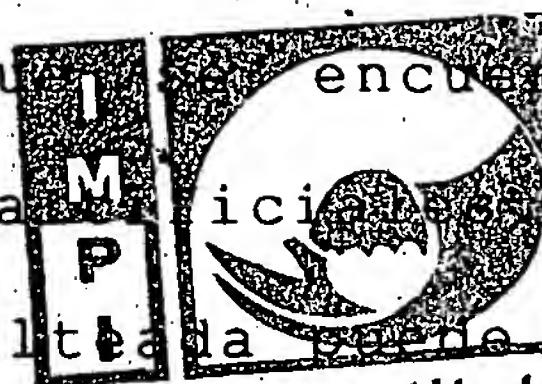
5: Muy fresco.

Además, un número cada vez mayor de consumidores desea un producto de cerveza totalmente natural que muestre las

cualidades mencionadas anteriormente y que encuentre totalmente libre de aditivos o suplementos a la cebada.

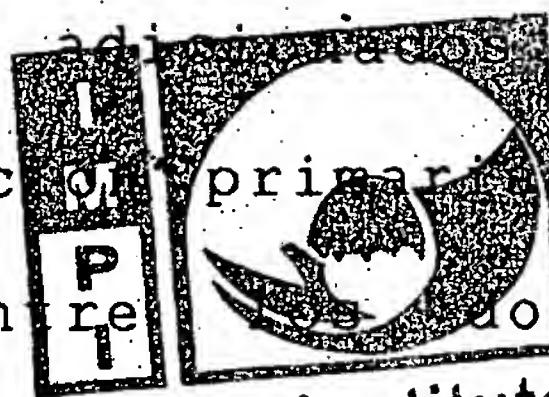
Se sabe en la técnica que la cebada malteada tiene que ser reemplazada en su totalidad, o en parte, por el llamado "adjunto cervecero". Los adjuntos cerveceros adecuados incluyen maíz, arroz, azúcar y diversos jarabes. Un adjunto cervecero utilizado en la producción de un mosto, como el maíz, generalmente es machacado y macerado de manera separada del macerado de la malta por medio de la adición de enzimas. Los productos prehidrolizados pueden mezclarse con el macerado de la malta, y pueden adicionarse jarabes al mosto en el momento en que el mosto se somete a ebullición, como se describió anteriormente. El uso de adjuntos para la industria cervecera necesita ser controlado de manera cuidadosa para producir cerveza de sabor y color aceptables. El uso de adjuntos de maíz, arroz y otros granos expande los ingredientes para la fabricación de cerveza más allá de los tradicionales listados anteriormente. Sin embargo, esta aproximación no es posible en algunos países -en Alemania, por ejemplo, todavía se siguen las Leyes para la Pureza de la Cerveza decretadas en 1516 ("Reinheitsgebot") que limitan los ingredientes para la fabricación de la cerveza a malta de cebada, agua, lúpulo y levadura.

Los compuestos adicionados a la mezcla del mosto, antes de la fermentación primaria, se denominan "ayudas para el



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

proceso". Por otro lado, los compuestos adicionados a la mezcla del mosto después de la fermentación primaria son llamados "aditivos". La diferencia entre los dos es importante debido a que el uso de aditivos se encuentra reglamentado, mientras que el uso de las ayudas para el proceso, no.



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

Sabor.

Como se mencionó anteriormente, el sabor es un factor clave en la calidad de una bebida de malta como la cerveza. Es importante que una cerveza retenga su sabor fresco y carácter originales durante su distribución y almacenamiento. Por consiguiente, los sabores indeseables son un gran problema para los fabricantes y distribuidores de cerveza. El sabor azorrillado es un sabor indeseable bien conocido que se forma durante el almacenamiento de la cerveza embotellada, como lo es el sabor indeseable originado por la contaminación con microorganismos. Otros sabores indeseables que son producidos durante el almacenamiento son expresados como sabor a papel, a cartón, oxidado o, en general, echado a perder. A temperatura ambiente, el sabor echado a perder en la cerveza enlatada o embotellada empieza a desarrollarse poco después del envasado, y se incrementa gradual y continuamente hasta un grado que la mayor parte de los fabricantes Americanos de cerveza recogen su producto del mercado si tiene más de



envasado.

24

Instituto

Mexicano

de la Propiedad

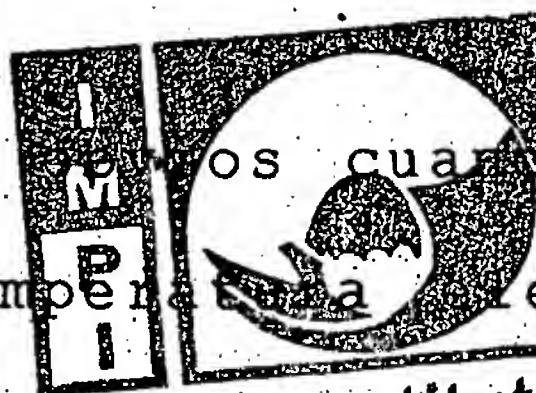
Industrial

aproximadamente 4 meses después de la fecha de envasado. Aunque el oxígeno dentro de una botella o la cerveza es consumido por la cerveza típicamente dentro de las 24 horas de su envasado, la presencia notoria de sabor echado a perder generalmente no aparece durante las 5 semanas.

En el pasado, el sabor echado a perder de las bebidas fermentadas de malta, como la cerveza, generalmente había sido atribuido a los efectos combinados de la oxidación, la 10 luz y el calor. La mayor parte de los investigadores se habían enfocado a métodos para la reducción de la oxidación en el producto terminado. Por ejemplo, la práctica presente de retardar la rancidez de la cerveza incluye mantener un bajo nivel de aire (o de oxígeno) en la cerveza envasada 15 minimizando el espacio libre en el cuello de la botella.

Las modernas máquinas llenadoras de cerveza están diseñadas para lograr niveles muy bajos de aire en el producto envasado. Típicamente, la botella es evacuada antes de ser llenada con la cerveza, o el aire en la botella evacuada es 20 reemplazado con dióxido de carbono antes del llenado, o se utiliza un sobre-espumado de la botella para desplazar los gases del cuello de la botella con la espuma de la cerveza.

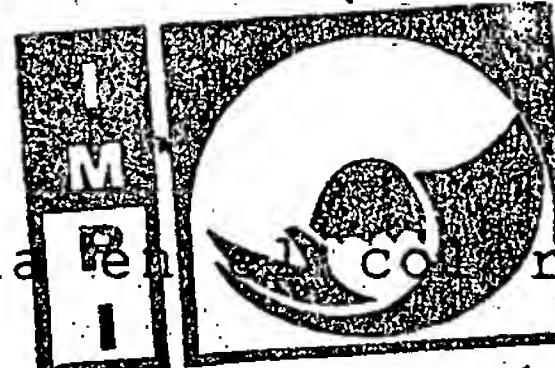
Todas estas prácticas pueden producir niveles de aire menores a 0.5 ml por botella de 12 oz (350 ml). Pero, aún 25 estos bajos niveles de aire todavía permiten que la cerveza se oxide en 2-3 meses.



Los sabores indeseables se hacen más fuertes cuando la bebida de malta ha sido almacenada a temperaturas elevadas (reacciones térmicas). La influencia negativa de los isohumulones y las melanoidinas en la oxidación de los alcoholes a temperaturas elevadas ha sido conocida por muchos años. Ver, e.g., Hashimoto, Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co. Ltd. 19:1 (1979). Sin embargo, aunque la cerveza es almacenada, idealmente, a temperaturas bajas, mantener una temperatura uniformemente baja durante el transporte no siempre es posible. Este es un problema particular en los países cálidos y húmedos, donde la temperatura varía de 28-38°C, aún más en aquellos países donde la moderna refrigeración no se encuentra siempre disponible. Por lo tanto, claramente existe la necesidad de un método confiable para estabilizar el sabor de la cerveza, que no se base en condiciones ambientales específicas que no pueden controlarse, después de que el producto envasado ha dejado la cervecería.

20 La reacción de Maillard.

Hace más de 80 años, Louis Maillard fue el primero en investigar la reacción de los azúcares reductores con los grupos amino libres de los aminoácidos y las proteínas. Esta reacción compleja, denominada la reacción de Maillard, o de oscurecimiento no enzimático, es responsable del aroma y sabor en los alimentos cocidos o conservados.



Especificamente, se sabe que está involucrada en el aroma y el sabor de las bebidas fermentadas de malta como la cerveza o el sake.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Como se esquematiza en la Figura 1, la reacción de

5 Maillard es iniciada por la reacción de las aminas primarias (de los aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos) con los azúcares para formar iminas (bases de Schiff) que posteriormente sufren un reacomodo para formar los productos de Amadori, que son los responsables del 10 oscurecimiento y del proceso fluorescente, lo cual da como resultado posteriormente la formación de numerosos productos finales de reacciones de glicosilación avanzadas.

En términos generales, los productos finales de la reacción de glicosilación avanzada son llamados compuestos 15 intermedios de α -carbonilo, incluyendo, por ejemplo, 1-desoxidicetosas y 3-desoxialdocetosas. Cuando el azúcar reducido es glucosa, como en el proceso de fabricación de cerveza de la malta, uno de los compuestos intermedios de α -carbonilo es la 3-desoxiglucosona.

20 Cientos de compuestos, incluyendo dextrinas, polipéptidos, alcoholes, polifenoles, isohumulones, melanoidinas, ácidos grasos y aldehídos, así como compuestos precursores e intermediarios relacionados, se encuentran involucrados durante el proceso de fabricación 25 de la cerveza en la reacción de Maillard. Por ejemplo, existen más de 140 reductasas y deshidrogenasas en la

superfamilia de reductasas involucradas en la reacción de Maillard.

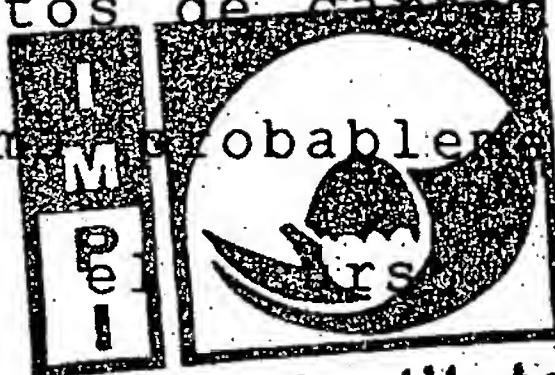


Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

Se sabe que un amplio intervalo de carbonilo son reducidos mediante la reacción de Maillard durante la fermentación, particularmente de la mosto, y para producir sabores indeseables (ver Møller et al., *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 12:151-168 (1975)). Dos rutas biológicas controlan el nivel de los compuestos de carbonilo en el producto final -la formación de aldehídos a partir de las reservas de oxiácidos y la eliminación enzimática de los compuestos de carbonilo del mosto por la levadura de cerveza.

Los alcoholes superiores y los correspondientes aldehídos son formados parcialmente por procesos anabólicos a partir de la fuente principal de carbono, y parcialmente a través de la ruta catabólica a partir de aminoácidos exógenos. Además, los aldehídos producidos durante la fermentación, el macerado y la ebullición son conocidos como substratos potenciales para las deshidrogenasas o reductasas del aldehído. Peppard et al., *J. Inst. Brew.* 87:386-390 (1981). Sin embargo, estudios recientes han indicado que los sistemas reductores de aldehído son más complejos de lo que antes se suponía. Ver Collins et al., *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 23:409-416 (1991); Kronlof et al., *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 22:355-362 (1989). Ahora se reconoce que muchos sistemas enzimáticos se encuentran

involucrados en la reducción de los compuestos de carbonilo en alcoholes superiores, y que cada sistema probablemente opera con actividades variables durante el transcurso del proceso de fermentación (Debourg et al., *J. Am. Chem. Soc.* 52(3):100-106 (1994). Por ejemplo, los compuestos de carbonilo, particularmente los carbonilos insaturados son inestables. Estos compuestos se descomponen en cadenas más cortas, que se someten a la condensación de aldol.



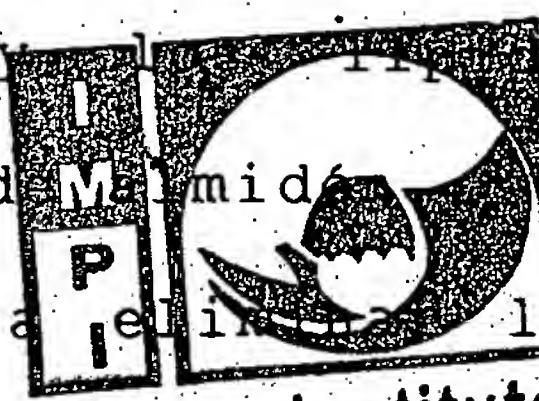
Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

Los aldehídos insaturados, notablemente el *trans*-2-nonenal, y los compuestos relacionados involucrados en la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, han sido asociados con el sabor echado a perder de la cerveza. Ver, e.g., Debourg et al., *supra*, y la Patente Norteamericana No. 4,110,480. Es bien sabido que la oxidación mediada enzimática, de los ácidos grasos insaturados, como el ácido linoléico, seguido por la subsecuente ruptura oxidativa, o no oxidativa, de la cadena de carbonos, producirá compuestos activos del sabor que tienen longitudes de 6 a 12. Por lo tanto, aquellos que intentan estabilizar el sabor de la bebida fermentada de malta se han enfocado, en algunos casos, en modificar los lípidos involucrados en el proceso de fabricación de la cerveza. Sin embargo, en la cerveza, los lípidos se derivan de la malta en formas diversas, incluyendo lípidos sencillos (ácidos grasos, triglicéridos y otros lípidos neutros), los lípidos

complejos (glicolípidos y fosfolípidos) y los
ligados, como aquellos ligados a los granos de maíz.

Se han intentado numerosos métodos para eliminar los lípidos de las materias primas, incluyendo la eliminación del germen del grano, que contiene una cantidad importante de los lípidos encontrados en los cereales de las materias primas (pulido), (2) la eliminación de los lípidos de los cereales de las materias primas mediante extracción con etanol, (3) pretratamiento de los granos de cereal de las materias primas con una enzima que descompone lípidos (Patente Japonesa Examinada Publ. No. 22478/1973, Patente Japonesa No-examinada Publ. No. 55069/1987), y (4) eliminación de los lípidos mediante una filtración-separación especiales (Patente Norteamericana No. 5,460,836). Sin embargo, no todos los lípidos tienen un efecto adverso, i.e., el balance de estas formas de lípidos afecta sutilmente la calidad de la cerveza y la eficiencia del proceso de fabricación de la cerveza. Por consiguiente, aún después de varios años de estudio, seguimos sin conocer qué balance es el adecuado, o cómo la alteración del contenido total de lípidos afectará la estabilidad del sabor en el producto terminado, almacenado.

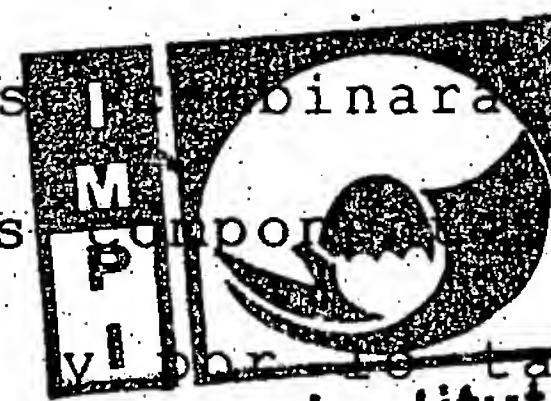
Otra técnica reconocida para estabilizar la cerveza contra la oxidación es adicionar un compuesto eliminador de oxígeno, como el dióxido de azufre, usualmente en forma de bisulfito, a la cerveza. El dióxido de azufre es producido



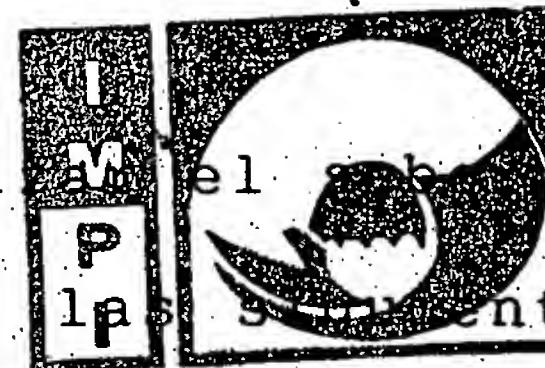
por la levadura durante la fermentación y se combinara con los compuestos de carbonilo para formar los compuestos de adición del bisulfito que son hidrofílicos y por lo tanto menos volátiles. Sin embargo, aunque es una adición efectiva, el incremento en la concentración de SO_2 de manera natural o artificial, puede ser comercialmente inaceptable. En los Estados Unidos, por ejemplo, el SO_2 está limitado por las leyes a menos de 10 ppm, y aún esos niveles bajos producen aromas indeseables y sulfurosos en algunas cervezas. En otros países, como Alemania, cualquier adición de SO_2 exógena se encuentra estrictamente prohibida.

Aún si se permite, la adición de bisulfito, que trabaja uniéndose a los aldehídos, no es una solución ideal. La cerveza es un producto complejo, que comprende muchos aldehídos diferentes (notablemente acetaldehido, un subproducto normal de la fermentación), de aquí que la acción de un aditivo de sulfito a menudo se ve reducida. También se ha intentado la adición de otros compuestos eliminadores de oxígeno, pero con un efecto muy pequeño en la estabilidad a largo plazo del sabor en la bebida fermentada de malta.

A pesar de toda la técnica disponible y de años de investigación, sin embargo, el sabor de la cerveza todavía se echa a perder. Por consiguiente, es claro que, hasta la presente invención, todavía permanece la necesidad en la



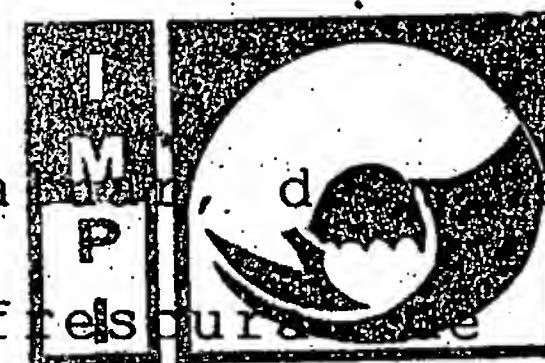
Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial



técnica de un método confiable para establecer el sabor de las bebidas fermentadas de malta, que tenga las siguientes características: (1) que no altere, de manera importante, el sabor fresco, deseable, del producto termoestabilizado, que 5 no reduzca de manera importante la eficiencia del proceso de fabricación de la cerveza; (3) que no viole ninguna ley o reglamento con respecto a la adición de aditivos o preservativos; y (4) que no dependa del hecho de mantener condiciones específicas ambientales para el transporte y 10 almacenamiento del producto envasado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN.

Los presentes inventores, deduciendo que los productos que se forman durante la reacción de Maillard podrían 15 utilizarse como indicadores del envejecimiento de la cerveza, desarrollaron un método (que utiliza indicadores medidos por una combinación de las técnicas de electroforésis capilar y HPLC) para verificar de manera confiable la estabilidad del sabor y el efecto 20 organoléptico del envejecimiento sobre la cerveza (Bravo et al., *IBTC Technical Consortium Meeting #35*, Salzburgo, Austria, Septiembre de 1993; Bravo et al., *IBTC Technical Consortium Meeting #36*, Caracas, Venezuela, Noviembre 1994). Utilizando el método para la detección de los 25 índices químicos relevantes, se ha desarrollado un nuevo sistema, significativamente avanzado sobre aquellos

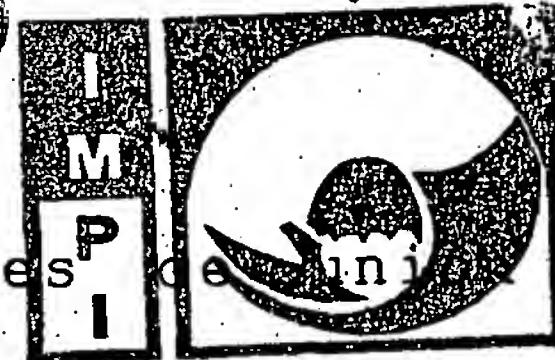


Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

descritos y utilizados hasta ahora, para evaluar, de forma dependiente y eficiente, el grado de frescura de la cerveza, y para determinar las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura) de la cerveza expuesta a un ambiente previamente desconocido. Además, estos sistemas analíticos han sido utilizados para desarrollar métodos para el mejoramiento de la estabilidad del sabor de las bebidas de malta, como la cerveza, y para producir bebidas de malta por éstos métodos.

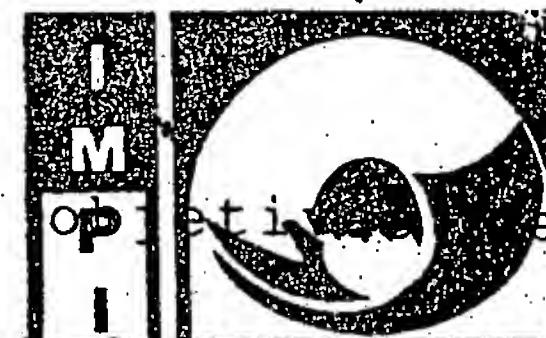
En las investigaciones iniciales, diseñadas para resolver los problemas mencionados anteriormente, se descubrió que regulando enzimáticamente la producción de ciertos compuestos intermedios de la reacción de Maillard formados durante el proceso de fabricación de la cerveza, podía producirse de manera confiable una bebida fermentada de malta que tuviera un sabor refrescante limpio y una estabilidad reforzada del sabor. Los presentes inventores realizaron investigaciones adicionales basados en este hallazgo y desarrollaron la presente invención.

Los presentes inventores han desarrollado un método totalmente nuevo para estabilizar el sabor de la malta fermentada enfocándose en un aspecto de la reacción de fabricación de la cerveza que no había sido considerado en la técnica previa. La presente invención, por lo tanto, está dirigida a la estabilización del sabor de una bebida fermentada de malta usando uno o más inhibidores,



bloqueadores, agentes reductores o agentes que inactiven los compuestos intermedios de la reacción de Maillard; estos agentes pueden incluir, por ejemplo, enzimas oxidorreductasas dependientes de NADPH o agentes químicos como la aminoguanidina.

Con el fin de evaluar la estabilidad del sabor, los inventores encontraron que era esencial tener un método sensible, rápido y reproducible por medio del cual puedan analizarse los cambios en el sabor de la cerveza. La evaluación sensorial ha sido el medio tradicional disponible para evaluar la calidad organoléptica de la cerveza. La evaluación del sabor, aunque es sensible, presenta limitaciones humanas, como las desviaciones personales y la tendencia a hacer evaluaciones comparativas (subjetivas) más que objetivas (Mathews et al., *Trends in Food Science & Technol.* 4:89-91 (1990)). El Instituto de Tecnología de la Fabricación de la Cerveza (Institute of Brewing Technology) empezó utilizando análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de acuerdo con, e.g., Greenhoff y Wheeler, *J. Inst. Brew.* 86:35 (1981); Strating y Drost, *Dev. in Food Sci.* 17:109-121 (1988). Se aplicaron métodos mejorados utilizando técnicas de purga y eliminación, cromatografía de gases y detección selectiva de masa utilizando la técnica SIM para establecer una mayor capacidad y mejor separación, determinación e identificación. Ver, e.g., Narziß et al., *MBAA Tech. Q.*



Instituto

Mexicano

de la Propiedad

Industrial

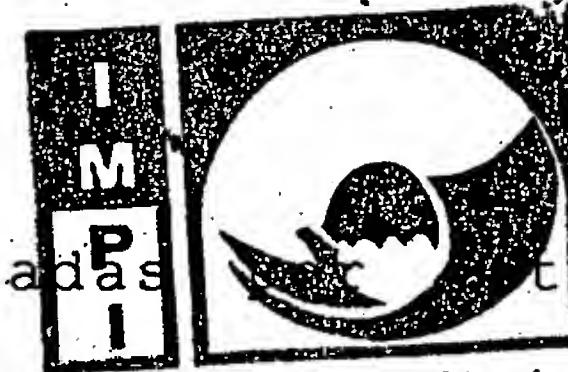
30:48-53 (1993). Sin embargo, las mediciones objetivas
un parámetro de calidad particular son inútiles a menos que
se correlacionen con la respuesta humana a la bebida
un todo cuando se compra y se consume bajo condiciones
normales.

Por consiguiente, los presentes inventores
desarrollaron un sistema por el cual el deterioro
organoléptico de la cerveza puede ser evaluado mediante
índices analíticos que proporcionan una serie de compuestos
(ver Figura 2) que proporcionan un espectro continuo
reproducible desde la forma fresca hasta la deteriorada
(echada a perder). Estos índices analíticos se relacionan,
entonces, con las evaluaciones organolépticas, como se
demuestra en las Figuras 3A y 3B, para proporcionar una
correlación entre las mediciones objetivas y organolépticas
de la frescura del sabor. Bravo et al., IBTC Technical
Consortium Meeting #35, Salzburgo, Austria, Septiembre
1993; Bravo et al., IBTC Technical Consortium Meeting
#36, Caracas, Venezuela, Noviembre 1994. Estos compuestos
participan en las reacciones involucradas en el proceso de
descomposición de la cerveza (substratos, compuestos
intermedios o productos finales), pero no necesariamente
producen el sabor de descomposición. Estos índices
analíticos son relativamente fáciles de detectar y muestran
un cambio importante en sus áreas de pico relativas durante
el proceso de envejecimiento (ver las Figuras 3A y 3B).



La concentración de furfural, 5-metilfurfural, acetilfurano y 5-hidroximetilfurfural son ~~índices valiosos~~ para medir el daño por calor en la cerveza. Por ejemplo, en un esfuerzo por establecer una "prueba del deterioro de la calidad", se han desarrollado métodos para detectar el furfural y el 5-metilfurfurolo en los jugos de frutas durante el almacenamiento. Harayama et al., *Agric. Biol. Chem.* 55:393-398 (1991) encontró por medio de análisis multivariado del sabor indeseable en los compuestos volátiles del espacio vacío en el cuello de la botella durante el almacenamiento de la cerveza, que ciertos compuestos de furfural eran un índice valioso para medir un sabor particular a cartón en la cerveza. Gröngvist et al., *EBC Cong.* 421-428 (1993), usando cromatografía de gases para medir los compuestos de carbonilo presentes durante la producción y envejecimiento de la cerveza, encontró que la concentración de furfural se incrementaba significativamente durante el envejecimiento.

La presente invención se dirige a la producción de bebidas de malta que tienen una estabilidad mejorada del sabor. La invención tiene utilidad particular en la producción de bebidas fermentadas de malta, como la cerveza, aunque la invención también puede ser utilizada de manera ventajosa en la producción de otras bebidas de malta con sabor. La invención se dirige además a métodos de fabricación de cerveza para producir bebidas fermentadas de



Instituto

Mexicano

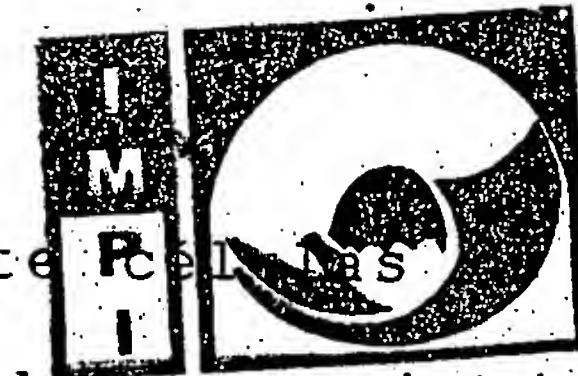
de la Propiedad

Industrial

malta, como la cerveza, las bebidas preparadas por este método, y bebidas que tienen un sabor sustancialmente estabilizado.

En particular, la presente invención se dirige a un 5 método para estabilizar el sabor de una bebida fermentada de malta, más particularmente cerveza, por medio de la adición de una o más enzimas reductasas incluyendo, aunque no se limita a, oxidorreductasas, como las reductasas de aldehído (EC 1.1, incluyendo las reductasas de aldosa, 10 reductasas de aldotcarbonilo y reductasas de oxoaldehído), ceto reductasas (EC 1.2, incluyendo reductasas de cetosas y reductasas de cetocarbonilo), reductasas de acetilo (EC 1.3), aminoreductasas primarias (EC 1.4), aminoreductasas secundarias (EC 1.5) y particularmente oxidorreductasas de 15 NADH/NADPH (EC 1.6, más particularmente isozimas de la Vieja Enzima Amarilla) (Old Yellow Enzyme) (OYE; EC 1.6.99.1) como la OYE1 (SEQ ID NO: 1), OYE2 (SEQ ID NO: 2) y OYE3 (SEQ ID NO: 3). La invención también se relaciona con las bebidas fermentadas de malta (particularmente 20 cervezas) preparadas por medio de estos métodos, y con bebidas fermentadas de malta (particularmente cervezas) que tienen una estabilidad reforzada del sabor.

La invención se relaciona además con el uso, durante el proceso de fabricación de la cerveza, de enzimas reductasas 25 como las que se describieron anteriormente a partir de fuentes naturales (e.g., células de levadura como las



células de *Saccharomyces spp.* y particularmente las de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces carlsbergensis* para estabilizar el sabor de la bebida fermentada de malta resultante y para producir una bebida fermentada de malta

que tenga un sabor estable. También se relaciona con microorganismos, particularmente levaduras, células bacterianas y células animales (incluyendo células de insectos) que han sido modificadas, seleccionadas o tratadas con ingeniería genética de manera específica, para expresar o secretar una o más de las enzimas reductasas descritas anteriormente, que pueden ser utilizadas durante el proceso de fabricación de la cerveza para estabilizar el sabor de la bebida fermentada de malta, resultante, para producir una bebida fermentada de malta que tiene un sabor estable.

La presente invención también proporciona digeridos enzimáticos de fuentes naturales (e.g., células de levadura) o de células modificadas genéticamente (e.g., las células de levadura, bacterianas o animales modificadas genéticamente, descritas anteriormente), o extractos de las mismas, que proporcionarán una cantidad suficiente de las enzimas necesarias para bloquear, inhibir o reducir los productos intermedios de la reacción de Maillard (e.g., 3-desoxiglucosona), que dan como resultado la formación del sabor descompuesto en las bebidas fermentadas de malta.



La presente invención también proporciona métodos para reforzar la estabilidad del sabor de una bebida de malta. De acuerdo con la presente invención, estos métodos son adecuados para reforzar la estabilidad del sabor de una bebida fermentada de malta, especialmente cerveza. Por consiguiente, es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos de producción de la cerveza o de preparación de la cerveza, donde se refuerce la estabilidad del sabor de la cerveza. Un primer método de la invención comprende adicionar una o más de las fuentes naturales descritas anteriormente (e.g., células de levadura), fuentes modificadas genéticamente (e.g., células de levadura, bacterianas o animales modificadas genéticamente), digeridos o extractos enzimáticos, o enzimas reductasas purificadas, y uno o más cofactores de la enzima reductasa (como NADH o NADPH) al grano de malta, mezcla del mosto (antes de, o después de, la fermentación) o a la bebida fermentada de malta (antes de, o después de, su procesamiento), bajo condiciones que favorezcan el refuerzo de la estabilidad del sabor de la bebida fermentada de malta, terminada. Un segundo método de la invención comprende inmovilizar las fuentes enzimáticas descritas anteriormente, los digeridos o los extractos, o las enzimas purificadas y los cofactores de la enzima reductasa, sobre un soporte sólido y poner en contacto el grano de malta, la mezcla del mosto (antes o después de la



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

fermentación) o de la bebida fermentada de malta (ante o después de su procesamiento), con estas enzimas o cofactores de reductasa bajo las condiciones que favorezcan el refuerzo de la estabilidad del sabor en la bebida fermentada de malta, terminada. De acuerdo con este aspecto de la invención, el soporte sólido puede ser una membrana (como microcelulosa, diazocelulosa, nílon, etc.), un lecho (como un lecho de alginato, un lecho de poliestireno, un lecho de látex, un lecho de vidrio, un lecho magnético o paramagnético, etc.), una placa de poliestireno, y similares. Los más preferidos son las membranas y los lechos. En una modalidad particularmente preferida de este aspecto de la invención, uno o más cofactores de la enzima, como el NADH o NADPH, y una o más isoenzimas de la oxidoreductasa de NADPH, OYE (EC 1.6.99.1) como la OYE1 (SEQ ID NO: 1), OYE2 (SEQ ID NO: 2) u OYE3 (SEQ ID NO: 3), o células (naturales o modificadas genéticamente) o extractos de las mismas que comprendan una o más isoenzimas OYE, son inmovilizadas en un soporte sólido y utilizadas en los métodos de la invención para producir una bebida fermentada de malta, particularmente cerveza, que tiene una estabilidad del sabor reforzada.

La invención además proporciona las bebidas de malta producidas por estos métodos. De acuerdo con la presente invención, la bebida de malta puede ser una bebida fermentada de malta, particularmente cerveza. Por



consiguiente, es un objetivo de la presente invención proporcionar una cerveza en la cual la estabilidad del sabor haya sido reforzada.

Otras modalidades preferidas de la presente invención 5 se harán aparentes para cualquiera entrenado en la técnica a la luz de las siguientes figuras y descripción de la invención y de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la Reacción de Maillard, el 10 mecanismo propuesto de la formación de LC18 en la cerveza, y su posible relación con el deterioro del sabor. El LC18 es un precursor de un compuesto de dicarbonilo de 5-HMF, que también puede condensarse con aminoácidos a través de 15 la degradación de Strecker para producir aldehídos y pirroles o pirazinas (CE3).

Figura 2. Cromatograma de una cerveza fresca que muestra los índices químicos del envejecimiento de la cerveza: LC8, LC11, LC18 y 5-HMF.

Figura 3. A: Gráfica que muestra los cambios en la 20 intensidad de la altura del pico de LC18 durante el almacenamiento a 5°C y su correlación con la evaluación del sabor. El LC18 es consumido a bajas temperaturas y tiende a desaparecer con el tiempo.

B: Gráfica que demuestra los cambios en la 25 concentración del 5-HMF durante el almacenamiento de

cerveza a 28°C, y su correlación inversa con el grado de oxidación.

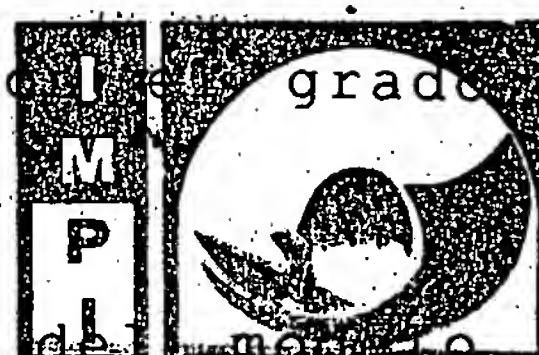


Figura 4. Cromatograma de un sistema de modelo de glucosa-glicina, tratado con calor, que consiste en 1 M + glicina 0.5 M, después de 3 horas de reacción a 90°C, que demuestra la adquisición de los índices analíticos del envejecimiento de la cerveza (LC8, LC11 y LC18) en un sistema modelo.

Figura 5. Cromatograma compuesto que demuestra el efecto de la adición de 1,2-fenilendiamina al mosto. A: mosto. B: mosto + 1,2-fenilendiamina. La adición de 1,2-fenilendiamina origina una reducción específica en el pico de LC18.

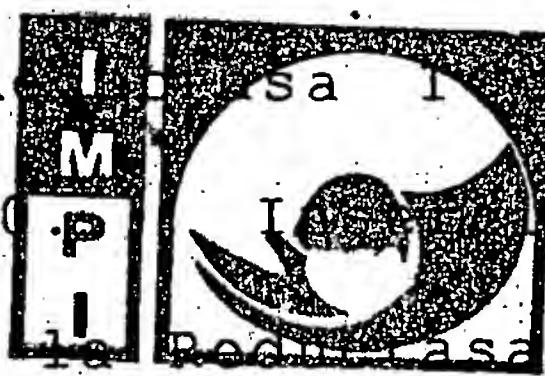
Figura 6. a: Gráfica de barras que demuestra los cambios en el área de las quinoxalinas hidrofóbicas que acompañan al almacenamiento de la cerveza a 5°C y 28°C durante 15 días y a 60°C durante 3 días.

b: Gráfica de barras que demuestra los cambios en el área de las quinoxalinas hidrofílicas que acompañan al almacenamiento de la cerveza a 5°C y 28°C durante 15 días y a 60°C durante 3 días.

Figura 7. Esquema del procedimiento de purificación de la enzima reductasa. Amortiguador A: fosfato de potasio 25 mM, pH 7.5. Amortiguador B: fosfato de potasio 5 mM, pH 6.5. Amortiguador C: fosfato de potasio 25 mM, pH 7.0.

Figura 8. Perfil de elución de la Reductasa 1 en cromatografía sobre Sephadex S-200. Inserción: electroforésis en gel SDS-poliacrilamida de la Reductasa 1.

El gel fue teñido con Azul Brillante de Coomassie.



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

Figura 9. Perfil de elución de la Reductasa 2 en cromatografía sobre Sephadex S-200. Inserción: electroforésis en gel SDS-poliacrilamida de la Reductasa 2.

El gel fue teñido con Azul Brillante de Coomassie.

Figura 10. Especificidades del sustrato de las enzimas Reductasa 1 y Reductasa 2.

Figura 11. Cromatograma compuesto que demuestra la reducción del pico de LC18 en la cerveza después de la adición de las Reductasas 1 y 2 aisladas de la levadura de cerveza.

Figura 12. Gráficas de barras que demuestran el grado de frescura determinado de manera organoléptica de las cervezas tratadas con la Reductasa 1. Las cervezas fueron incubadas con una mezcla de amortiguador C, NADPH (cervezas control) y Reductasa 1 (cervezas experimentales) durante 15 días a 28°C (panel a) o 3 días a 60°C (panel b).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones.

En toda la descripción, se utilizan diversos términos que normalmente son comprendidos por aquellos entrenados en la técnica y que son aplicables en la técnica relacionada.

Se utilizan diversos términos con un significado

específico, sin embargo, tienen el significado que se indica a continuación:



Tal como se utiliza aquí, el término "malta" se refiere a cualquier grano de cereal, particularmente maíz, remojado en agua hasta que germine y que es utilizado en la fabricación de cerveza y en procesos de destilación.

El término "macerado", tal como se utiliza aquí, es definido como malta o grano machacado remojado en agua caliente para fabricar un mosto.

El término "mosto", tal como se utiliza aquí, se define como el licor obtenido después de extraer un material sólido preparado, como granos de cereal o malta, con agua caliente.

Tal como se utiliza aquí, el término "bebida fermentada de malta" significa cualquier bebida saborizada de malta que se produce mediante fermentación, como la cerveza o el sake.

Tal como se utiliza aquí, el término "cerveza" se define como una bebida alcohólica que se obtiene a partir de la malta y el lúpulo, en el proceso de fabricación de la cerveza. El término tal como se utiliza aquí, incluye cerveza inglesa (ale, fermentación alta), cerveza no madurada (stout), cerveza de fermentación baja (lager), "porter", licores de malta, cervezas con bajas calorías, bajo contenido de alcohol, y cervezas ligeras, y similares.



Antes de la presente invención, no existía sugerencia alguna en la técnica de que, mediante la reacción enzimática de la producción de uno o más intermedios específicos de la reacción de Maillard (Figura 1), el sabor de la cerveza podía ser estabilizado de manera efectiva. Además, el uso de una reductasa específica como una ayuda enzimática de regulación al proceso, en la producción de cerveza, no había sido sugerido hasta ahora. Históricamente, la mayor parte de los ensayos utilizados para evaluar la estabilidad del sabor de la cerveza han sido puramente subjetivos (e.g., paneles clásicos de catadores de cerveza) y no habían podido conducir a la cuantificación. Por lo tanto, fue necesario que los presentes inventores primero desarrollaran un ensayo analítico objetivo, confiable, para determinar la estabilidad del sabor de una muestra, el cual pudiera utilizarse además de las evaluaciones organolépticas, antes de que pudieran implementarse nuevos procedimientos o los aditivos ser caracterizados en términos de sus efectos sobre la estabilidad del sabor.

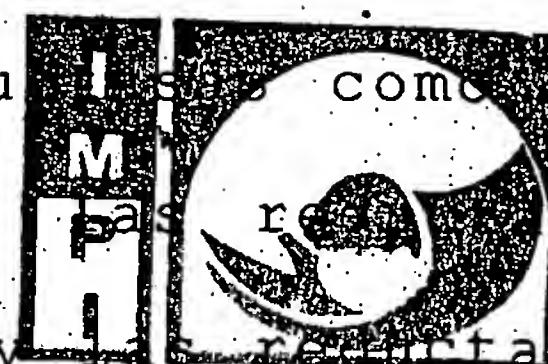
La invención, por lo tanto, se relaciona con métodos para estabilizar el sabor de una bebida fermentada de malta, como la cerveza, y con bebidas fermentadas de malta como las cervezas producidas por estos métodos. Los métodos de la invención típicamente comprenden el uso de uno o más inhibidores, bloqueadores, agentes reductores o agentes de



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

unión, para inhibir, bloquear, reducir, unir o inactivar, de cualquier otro modo, uno o más compuestos intermedios de la reacción de Maillard que se están involucrados en la causa del sabor echado a perder de las bebidas fermentadas de malta. Los inhibidores, bloqueadores, agentes reductores y agentes de unión utilizados en los presentes métodos pueden ser cualquier agente, compuesto, composición, etc., que inhiba, bloquee, o inactive, de cualquier otro modo, uno o más compuestos intermedios de la reacción de Maillard, estabilizando de este modo el sabor de una bebida fermentada de malta. Estos agentes pueden incluir, aunque no se limitan a, enzimas (particularmente enzimas reductasas), complejos de enzimas, células (particularmente células de levadura como las del género *Saccharomyces*), extractos o digeridos celulares que contienen enzimas, complejos enzima-cofactor o agentes químicos como la aminoguanidina. Particularmente preferidos son las enzimas y los agentes químicos.

Por consiguiente, un aspecto particularmente preferido de la presente invención proporciona un método donde se utiliza una cantidad que sirve para estabilizar el sabor, de al menos una enzima reductasa, como aditivo a la bebida fermentada de malta. Este aditivo enzimático proporciona una estabilización reforzada del sabor de la bebida fermentada de malta terminada. Las enzimas reductasas adecuadas para utilizarse en estos métodos de la invención

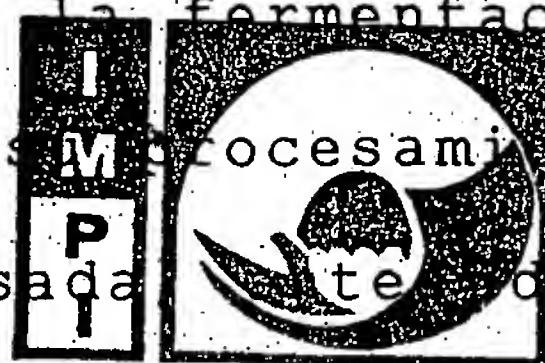


Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

incluyen, aunque no se limitan a, oxidoreductasas como las
reductasas de aldehido (EC 1.1, incluyendo las reductasas
de aldosa, las reductasas de aldotcarbonilo y las reductasas
de oxoaldehido), las reductasas de grupos ceto (EC 1.2,
5 incluyendo las reductasas de cetosas y las reductasas de
cetocarbonilo), las reductasas de acetilo (EC 1.3),
aminoreductasas primarias (EC 1.4), aminoreductasas
secundarias (EC 1.5), y particularmente las oxidoreductasas
de NADH/NADPH (EC 1.6, más particularmente las isoenzimas
10 de la Vieja Enzima Amarilla (OYE; EC 1.6.99.1) como la OYE1
(Saito, K., et al., *J. Biol. Chem.* 266(31):20720-20724
(1991); SEQ ID NO: 1), OYE2 (Stott, K., et al., *J. Biol.*
Chem. 268(9):6097-6106 (1993); SEQ ID NO: 2), y OYE3
(Niino, Y. S., et al., *J. Biol. Chem.* 270(5):1983-1991
15 (1995); SEQ ID NO: 3). Sin embargo, debe comprenderse que
cualquier enzima reductasa que sea efectiva para
estabilizar el sabor de una bebida fermentada de malta
puede ser utilizada en los presentes métodos para producir
las presentes bebidas fermentadas de malta.

20 En una modalidad de la invención, la(s) enzima(s)
reductasa(s) puede(n) ser adicionada(s) en cualquier etapa
del proceso de fabricación de la cerveza, incluyendo al
grano de malta, al mosto antes de la fermentación, al mosto
fermentado, a la bebida fermentada de malta antes del
25 procesamiento, o a la bebida fermentada de malta procesada
antes de envasarla. Más preferiblemente, la enzima

reductasa es adicionada al mosto antes de la fermentación, a la bebida fermentada de malta antes de su procesamiento, o a la bebida fermentada de malta, procesada antes de su envasado.



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

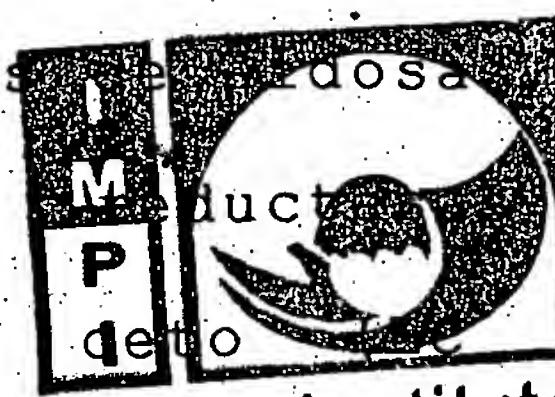
5 Preferiblemente, las enzimas reductasas se presentan de manera natural. Las enzimas pueden ser aisladas utilizando procedimientos conocidos de extracción de proteínas a partir de un cierto número de fuentes, y pueden ser purificadas como se describe más adelante, y luego ser 10 adicionadas a la bebida fermentada de malta como una ayuda al proceso y/o como un aditivo. En este esquema, las enzimas reductasas pueden ser adicionadas al proceso de fermentación de manera continua o como una sola inyección. Los métodos de la presente invención pueden efectuarse 15 utilizando bien sea enzimas completas o fragmentos biológicamente activos de las mismas. Como forma alternativa de la enzima, pueden utilizarse ciertas enzimas reductasas formuladas de manera sintética, completas o atenuadas, en lugar de las enzimas naturales, para 20 estabilizar el sabor del producto fermentado de malta, siempre y cuando la forma alternativa de la enzima posea la actividad biológica de la enzima reductasa natural.

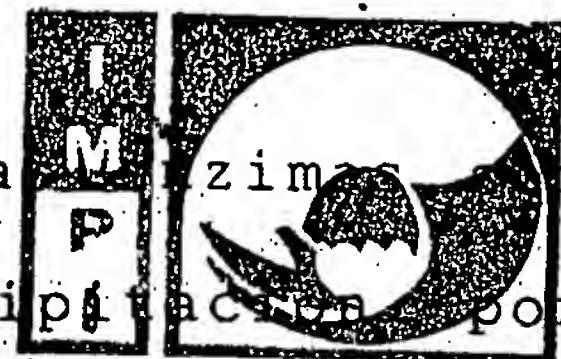
En un aspecto particularmente preferido, la enzima reductasa aislada, purificada y/o utilizada en los métodos 25 de la presente invención, es una enzima oxidoreductasa incluyendo, aunque no se limita a, una reductasa de

aldehido (EC 1.1, incluyendo las reductasas de aldehido las reductasas de aldotcarbonilo y las reductasas de oxoaldehido), una reductasa de grupos de deto (EC 1.2, incluyendo reductasas de cetosa y reductasas de cetocarbonilo), una reductasa de acetilo (EC 1.3, una aminoreductasa primaria (EC 1.4), una aminoreductasa secundaria (EC 1.5) o una oxidoreductasa dependiente de NADH/NADPH (EC 1.6, más particularmente, las isoenzimas de la Vieja Enzima Amarilla (OYE; EC 1.6.99.1) como OYE1 (SEQ ID NO: 1), OYE2 (SEQ ID NO: 2) y OYE3 (SEQ ID NO: 3)). Más preferiblemente, la enzima reductasa es una isoenzima de OYE (EC 1.6.99.1) como OYE1 (SEQ ID NO: 1), OYE2 (SEQ ID NO: 2) y OYE3 (SEQ ID NO: 3).

Las enzimas reductasas naturales se aislan preferiblemente de las células de levadura utilizando procedimientos de extracción de proteínas rutinarias, como se establece en el Ejemplo 1 más adelante, o de fuentes animales o vegetales. Como fuentes preferidas de las enzimas reductasas de oxoaldehido naturales se encuentran células de levadura, incluyendo levaduras cerveceras o de inoculación, e.g., del género *Saccharomyces*, más preferiblemente de las especies *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces carlsbergensis*.

Las enzimas reductasas aisladas de estas fuentes naturales pueden ser purificadas por medio de técnicas de purificación de proteínas que son rutinarias para aquellos



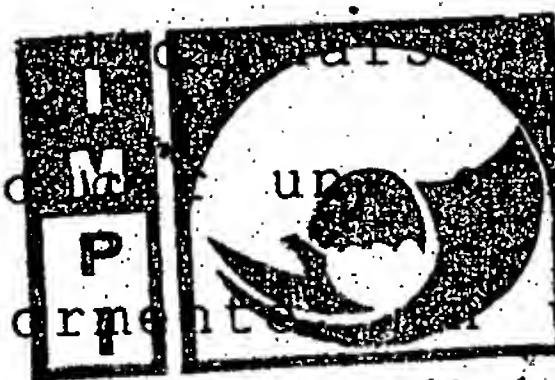


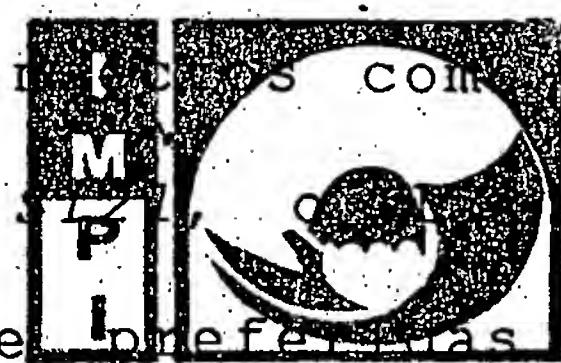
entrenados en la técnica. Preferiblemente, las enzimas son purificadas por una combinación de "precipitación por salado" ("salting out") y purificación cromatográfica como la cromatografía de líquidos, HPLC, FPLC, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión de tamaño, y cromatografía de inmunoafinidad. Más preferiblemente, las enzimas purificadas se purifican mediante una combinación de precipitación con sulfato de amonio y purificación con HPLC y FPLC. Estas enzimas reductasas purificadas pueden entonces ser adicionadas al producto, en cantidades que estabilicen el sabor, tal como se describió anteriormente, para reforzar la estabilidad del sabor de la bebida fermentada de malta.

En una modalidad alternativa, pueden adicionarse al producto preparaciones crudas de una o más de las enzimas reductasas descritas anteriormente, sin purificación. Las preparaciones crudas abarcadas por esta modalidad de la invención incluyen extractos o digeridos de las fuentes de levadura, animales o vegetales naturales. Se prefiere un extracto o digerido enzimático de células naturales o modificadas genéticamente (como se describe más adelante). Los métodos para preparar estos extractos o digeridos enzimáticos se encuentran bien descritos en la literatura microbiológica (ver, e.g., Difco Manual, Difco, Inc., Norwood, Massachusetts).

En otra modalidad alternativa, pueden ser fuentes (como levaduras) capaces de producir una cantidad suficiente para producir una cantidad efectiva de la reductasa de oxoaldehido *in situ*, para dar al producto terminado el sabor del producto terminado. Estas fuentes pueden también ser utilizadas para preparar una preparación cruda, preferiblemente un extracto o digerido enzimático, que comprenda cantidades reforzadas de una o más de las enzimas reductasas descritas anteriormente, el cual se utiliza entonces como se describe anteriormente para estabilizar el sabor de una bebida fermentada de malta. Preferiblemente, en esta modalidad se utilizan las levaduras del género *Saccharomyces*, y más preferiblemente, de las especies *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces carlsbergensis*.

Todavía, en otra modalidad, una variedad de células puede ser modificada genéticamente para producir cantidades reforzadas de una o más de las enzimas reductasas descritas anteriormente emparentadas con sus cepas madre o de tipo silvestre. Las células preferidas para utilizarse en este aspecto de la invención incluyen, aunque no se limitan a: células de levadura como las del género *Saccharomyces* (particularmente *S. Cerevisiae* o *S. carlsbergensis*); células bacterianas como las de los géneros *Escherichia* (particularmente *E. coli*), *Bacillus* (particularmente *B. cereus*, *B. subtilis* o *B. megaterium*) o *Xanthomonas*; y

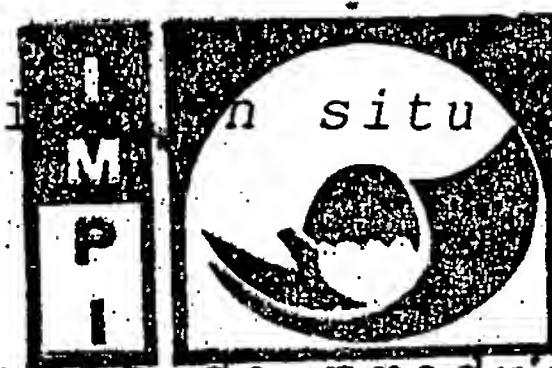




células animales (particularmente células de insectos como las células de *Spodoptera frugiperda* *Sf9* o las células de *Trichoplusia spp.*). Particularmente preferidas son las células de *Saccharomyces spp.* que han sido modificadas genéticamente para producir altos niveles de al menos una enzima reductasa, preferiblemente al menos una enzima oxidoreductasa como al menos una enzima oxidoreductasa dependiente de NADH, y más preferiblemente al menos una enzima seleccionada del grupo que consiste de 10 OYE1 (SEQ ID NO: 1), OYE2 (SEQ ID NO: 2) y OYE3 (SEQ ID NO: 3). Los métodos para modificar genéticamente estas células y otros microorganismos son bien conocidos y son rutina para aquellos entrenados en la técnica (ver, e.g., 15 Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a Ed., Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1987); Watson, J. D. et al., en: *Recombinant DNA*, 2^a Ed., New York: Scientific American Books, págs. 235-253 (1992)). Estas células genéticamente modificadas proporcionan una fuente fácilmente disponible 20 de las enzimas reductasas descritas anteriormente (como una preparación cruda o purificada) que puede ser adicionada como se describió anteriormente para estabilizar el sabor de una bebida fermentada de malta. Alternativamente, como en las modalidades previas, las células genéticamente modificadas, que tienen una expresión reforzada de la 25 reductasa, pueden ser adicionadas por se en una cantidad

suficiente para proporcionar la estabilización *in situ* del sabor de la bebida terminada de malta.

Si se adicionan *per se*, las células capaces de producir una o más enzimas reductasas pueden ser inmovilizadas en un 5 soporte sólido, a una densidad suficiente para producir industrial suficiente actividad enzimática para estabilizar sustancialmente el sabor de la bebida fermentada de malta terminada. Por consiguiente, en otro aspecto preferido de la invención uno o más de los inhibidores, bloqueadores, 10 agentes reductores o agentes de unión, descritos anteriormente, como una o más de las células productoras de enzimas reductasas, uno o más de los extractos o digeridos enzimáticos, o una o más de las enzimas reductasas purificadas, pueden ser inmovilizadas sobre un soporte 15 sólido para formar un "soporte sólido activo". Estos soportes sólidos activos pueden entonces ser utilizados en los presentes métodos para estabilizar el sabor de una bebida fermentada de malta. En el caso de las enzimas, los extractos, digeridos o células, estos compuestos pueden ser 20 inmovilizados en el soporte sólido en conjunción con uno o más cofactores enzimáticos, como el NADH o NADPH, para producir un soporte sólido que contenga enzimas. Por el término "soporte sólido" se quiere indicar cualquier soporte sólido sobre el cual pueda inmovilizarse una 25 célula, extracto o digerido enzimático, o una enzima purificada. Por el término "soporte sólido activo" se





Instituto

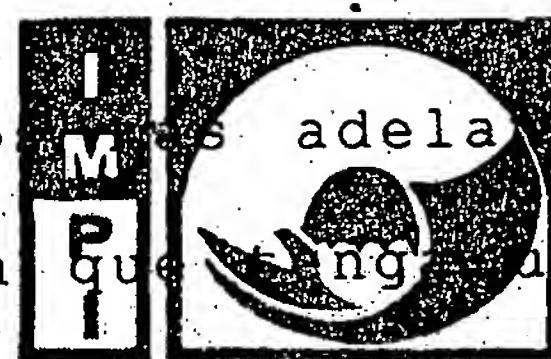
Mexicano
de la Propiedad

Industrial

indica un soporte sólido sobre el cual se inmoviliza al menos un inhibidor, bloqueador, agente reductor o agente de unión que inactive uno o más compuestos intermedios de la reacción de Maillard. Por el término "soporte sólido que contiene una enzima" se indica un soporte sólido sobre el cual se ha inmovilizado al menos una fuente de enzima (i.e., una célula que produce una enzima, un digerido o extracto que comprende la enzima, o una enzima purificada), y preferiblemente el (los) cofactor(es) correspondiente(s).

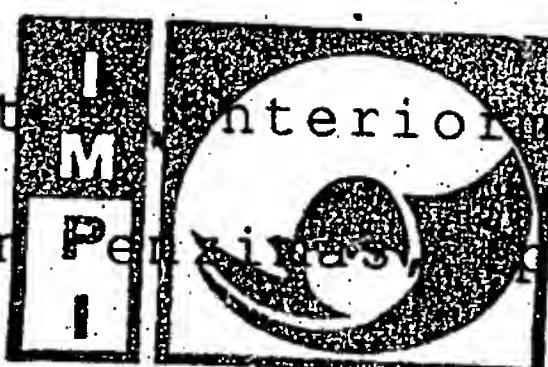
Los soportes sólidos que pueden ser utilizados en este aspecto de la invención incluyen, aunque no se limitan a, membranas (como las membranas de nitrocelulosa, diazocelulosa o de nailon), vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, dextran, Sepharosa, agar, almidón, nailon, perlas (particularmente perlas de alginato, látex, vidrio, DEAE-celulosa magnética o paramagnética) y placas de microtitulación de poliestireno. Particularmente preferidas son las membranas y las perlas.

En este aspecto particularmente preferido de la invención, una o más isoenzimas de la oxidoreductasa OYE (EC 1.6.99.1) dependiente de NADPH, como la OYE1 (SEQ ID NO: 1), OYE2 (SEQ ID NO: 2) y OYE3 (SEQ ID NO: 3), y uno o más cofactores como el NADH o preferiblemente NADPH, son inmovilizados sobre uno o más soportes sólidos, para producir un soporte sólido que contenga una enzima, el cual



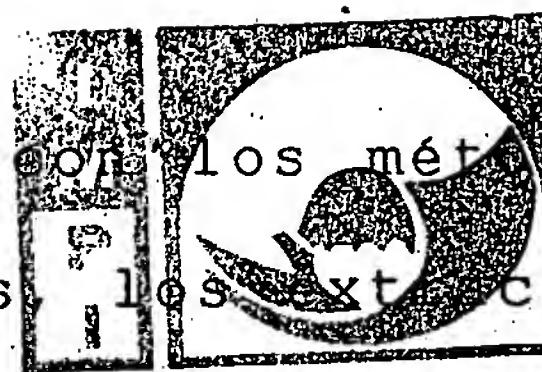
puede ser utilizado en los métodos descritos más adelante para producir una bebida fermentada de malta que tenga una estabilidad del sabor reforzada. En la técnica se describen métodos para acoplar al mismo tiempo las enzimas (crudas o purificadas) y los cofactores, mientras se mantiene la actividad enzimática (ver, e.g., Kragl, U., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 52:309-319 (1996); Nidetzky, B., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 52:387-396 (1996)).

Alternativamente, el soporte sólido que contiene la enzima puede comprender, además del cofactor o cofactores enzimático(s), una o más de las células genéticamente modificadas de la invención que producen cantidades reforzadas de una o más de las enzimas reductasas que estabilizan el sabor, descritas anteriormente. En el caso de las células inmovilizadas, el soporte en fase sólida es importante en términos de que proporciona un ambiente adecuado para el crecimiento de la célula y el contacto con el sustrato acuoso. Las células utilizadas en los presentes métodos pueden ser inmovilizadas sobre soportes sólidos y ser cultivadas de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica (ver, e.g., Patente Norteamericana No. 5,079,011). Además, el uso de células en crecimiento, inmovilizadas, en la fermentación y la producción de etanol ha sido previamente descrita (para revisiones, ver Godia, F., et al., *Process. Biochem.* 4:43-48 (1987), y de Gooijer, C. D., et al., *Enz. Microb. Technol.* 18:202-219 (1996)).



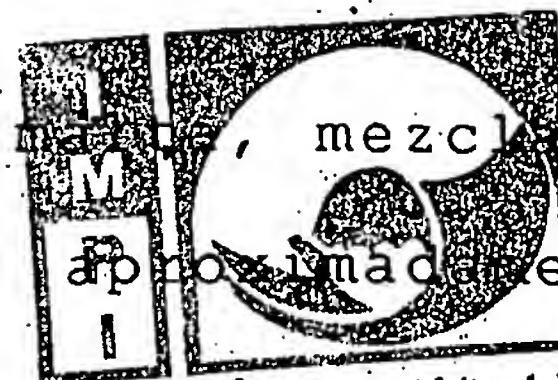
Los soportes sólidos activos descritos anteriormente, como los soportes sólidos que contienen ~~Penicillium~~, pueden entonces ser utilizados en los métodos para estabilizar el sabor de una bebida de malta. Estos métodos pueden 5 comprender, por ejemplo, poner en contacto ~~Industria~~ de malta, la mezcla de mosto (antes o después de la fermentación) o la bebida fermentada de malta (antes o después de su procesamiento) con uno o más soportes sólidos activos descritos anteriormente, bajo condiciones 10 adecuadas, para estabilizar el sabor de la bebida fermentada de malta, terminada, como se describió anteriormente. En un método particularmente preferido, estos soportes sólidos activos son utilizados para poner en contacto el mosto antes de la fermentación, la bebida 15 fermentada de malta antes de su procesamiento, o la bebida fermentada de malta procesada antes de su envasado. Más preferiblemente, la estabilización del sabor se logra poniendo en contacto la bebida fermentada de malta con uno o más de los soportes sólidos antes del envasado de la 20 bebida. La invención también proporciona una bebida fermentada de malta, como la cerveza, producida por estos métodos.

Como se notó anteriormente, en un aspecto particularmente preferido de la invención, los soportes 25 sólidos activos utilizados en estos métodos pueden comprender células inmovilizadas, extractos, digeridos o

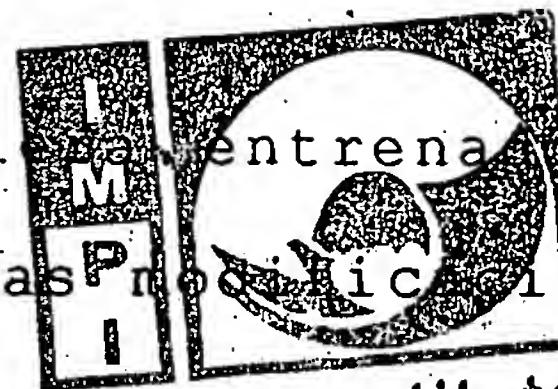


enzimas reductasas purificadas. De acuerdo con los métodos de este aspecto de la invención, las células, los extractos o digeridos, o las enzimas reductasas purificadas de la invención, trabajan en concierto con los cofactores enzimáticos para reducir los compuestos y precursores productores de los sabores indeseables en el grano de malta, el mosto o la bebida fermentada de malta, como se describió anteriormente. Los cofactores son entonces regenerados *in situ* sobre el soporte sólido sin manipulaciones adicionales (ver, Kragl, U., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 52:309-319 (1996); Nidetzky, B., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 52:387-396 (1996)). Por consiguiente, los presentes métodos proporcionan un sistema de producción continua para la estabilización enzimática de una bebida fermentada de malta. Además, debido a que las enzimas y los cofactores son inmovilizados sobre un soporte sólido, la bebida fermentada de malta resultante, que tiene estabilidad del sabor reforzada, puede ser considerada esencialmente libre de ayudas y aditivos al procesamiento tal como se describen estos compuestos anteriormente.

Las cantidades óptimas de las enzimas reductasas necesarias para estabilizar el sabor del producto de malta terminado fueron determinadas utilizando los métodos analíticos establecidos en los Ejemplos descritos más adelante. De acuerdo con estos métodos, los intervalos de concentración óptima, para las enzimas reductasas crudas o



purificadas adicionadas per se al grano de maíz, mezcladas con mosto o bebida de malta terminada, son de aproximadamente 5-500 unidades/ml; preferiblemente de aproximadamente 250 unidades/ml; más preferiblemente, de aproximadamente 25-100 unidades/ml; y más preferiblemente, de aproximadamente 50 unidades/ml. Para las enzimas inmovilizadas, los intervalos de concentración óptima son desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 600 unidades/cm²; desde aproximadamente 200 hasta aproximadamente 450 unidades/cm²; o desde aproximadamente 250 hasta aproximadamente 300 unidades/cm²; los intervalos de concentración óptima para los cofactores son desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 450 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$; desde aproximadamente 80 hasta aproximadamente 250 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$; o desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 150 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$. Tal como se utiliza aquí, una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 micromol de NADPH por minuto a 25°C. Debe hacerse notar que mientras estos intervalos se describen en términos de uso de una sola enzima reductasa, los métodos de la presente invención contemplan la adición de una o más proteínas adicionales, estabilizadoras del sabor, incluyendo las enzimas reductasas descritas anteriormente, simultánea, secuencial o mediante una sola inyección de dos o más componentes premezclados.



Será fácilmente aparente para cualquiera que esté entrenado en las técnicas relevantes que son obvias otras modificaciones y adaptaciones adecuadas a los métodos y aplicaciones que se describen aquí, y que pueden aplicarse sin salirse del alcance de la invención o de cualquier modalidad de la misma. Habiendo descrito ahora la presente invención detalladamente, la misma será comprendida más claramente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, los cuales son incluidos aquí para propósitos de ilustración solamente y no con el fin de limitar la invención.

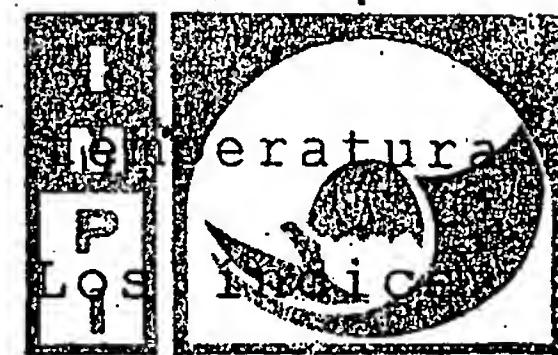
Ejemplos.

Materiales y métodos.

Los siguientes materiales y métodos fueron utilizados, en general, en los Ejemplos.

Evaluación organoléptica.

La evaluación organoléptica está diseñada para dar una indicación de la estabilidad de la cerveza embotellada, según se determina por métodos subjetivos (e.g., "la prueba de catado"). En esta aproximación, la cerveza tratada con enzima, filtrada, se envasa en botellas estándar de 275 ml, y las muestras se someten a un ciclo de enfriamiento (0°C durante 24 horas) y calentamiento (40°C durante 24 horas). El sabor de la cerveza es evaluado organolépticamente por catadores entrenados. Una muestra control de cerveza no



tratada con la enzima se somete al ciclo de temperatura al mismo tiempo para proporcionar un estándar. Los indicadores de sabor de estas cervezas tratada y no tratada son constituidos entonces para determinar la estabilidad medida de la propiedad industrial logra con el tratamiento de la cerveza con una enzima reductasa de oxoaldehido. Los resultados de esta prueba organoléptica son entonces comparados con los que se obtienen por medio de mediciones cromatográficas de los índices químicos del sabor que se describen más adelante.

10

Análisis de LC18 y 5-HMF.

El análisis de los índices químicos LC18 y 5-HMF fue efectuado por cromatografía líquida, usando el sistema HPLC de Waters, el cual consistía de una bomba 600, un automuestreador Wisp 717, el software Millenium 2010, Chromatography Manager v. 2.1. La separación se llevó a cabo en una columna Aminex HPX-87H, de 300 x 7.8 mm, 9 μ m, mantenida a 55°C. La elución fue monitoreada con un Detector de Arreglo de Fotodiodos Waters 991 (200 nm - 300 nm) y la cuantificación del pico de 5-HMF y LC18 fue llevada a cabo a 283 nm. Para el análisis, se inyectaron 50 μ l de cerveza desgasificada, por duplicado, y se eluyeron con H_2SO_4 0.05 M durante más de 25 minutos, a una velocidad de flujo de 1.0 ml/min. La cuantificación del 5-MHF se efectuó usando una curva externa de calibración de los

compuestos puros respectivos (Sigma, Saint Louis, Missouri).



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

Análisis de CE3.

5 Todas las muestras de cerveza fueron desgaseadas en un baño ultrasónico antes de la inyección y se analizaron por duplicado. Los análisis se efectuaron en un Sistema de Electroforésis Capilar 270A-HT de Applied Biosystems. Se utilizó un capilar de sílice fundida con un diámetro interno de 50 μm y 72 cm de longitud (50 cm hacia el detector) en todas las separaciones. Las muestras se inyectaron al vacío durante 3.5 segundos y las separaciones electroforéticas fueron efectuadas en amortiguador de citrato de sodio 20 mM, pH 2.5, a un voltaje de 15 kV 10 durante 20 minutos. La detección se llevó a cabo a 200 nm. 15 La adquisición de datos y el procesamiento se efectuaron utilizando un Software de Sistema de Análisis de Datos, Modelo 600 (Applied Biosystems) para Macintosh.

20 *Determinación de los compuestos dicarbonílicos con 1,2-fenilendiamina y determinación de las quinoxalinas por medio de HPLC.*

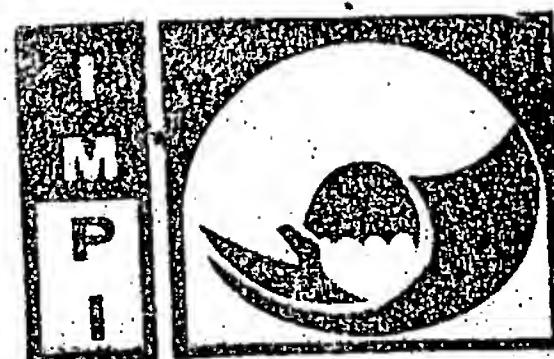
25 Se adicionó un volumen fijo (2.2 ml) de 1,2-fenilendiamina al 5% (OPD), en metanol, a una botella de cerveza (222 ml) que luego se volvió a tapar y se mantuvo a 20°C durante 12 horas. Después de 12 horas de reacción, se



extrajeron 25 ml de muestra con cloroformo. La fase orgánica de cloroformo fue eliminada por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos, se recuperó, se lavó con HCl 0.1 M (3 x 8 ml), con el fin de la Primaria Industrial de la Propiedad Industrial 5 1,2-fenilendiamina que no reaccionó, y se secó parcialmente con sulfato de magnesio. La fase orgánica parcialmente seca, que contenía los derivados hidrofóbicos de la quinoxalina, se secó en un equipo "rotavapor" hasta sequedad, y el residuo se resuspendió en 250 μ l de 10 acetonitrilo, y se diluyó 1/10 (50% de solvente A y 50% de solvente B) antes del análisis cromatográfico. Las quinoxalinas hidrofóbicas fueron analizadas usando el Método I (ver más abajo). La fase acuosa, que contiene las quinoxalinas hidrofilicas, fue inyectada directamente y se 15 analizó utilizando el Método II (ver más abajo).

Las condiciones cromatográficas fueron como sigue: se utilizó una columna Nova-Pack C18 (Waters) de 3.9 x 150 mm, 4 μ m. La fase móvil fue: solvente A, 95% de agua (Milli-Q) y 5% de acetonitrilo; solvente B, 90% de acetonitrilo y 10% de agua; velocidad de flujo de 0.7 ml/min. La elución fue monitoreada con un Detector de Arreglo de Fotodiodos (200 nm - 300 nm). Los resultados típicos se muestran en las Figuras 5 y 6.

25 Los Métodos I y II fueron como se indica a continuación:



Método I

Tiempo (min)	% de solvente A	% de solvente B
0	85	15
12	60	40
20	100	0

Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

Método II

Tiempo (min)	% de solvente A	% de solvente B
0	100	0
3	100	0
10	75	25
15	75	25

5

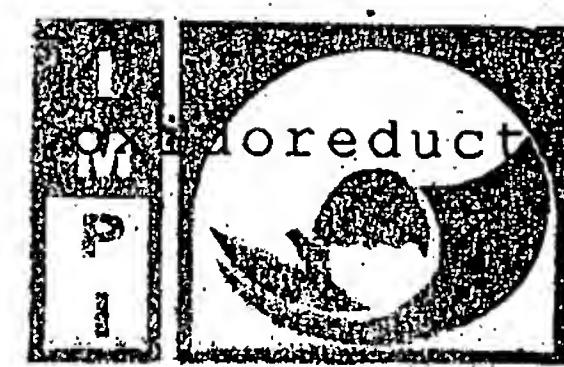
Ejemplo 1: Purificación de la oxidoreductasa dependiente de NADPH a partir de la Levadura de Cerveza.

Las células de levadura de cerveza para inocular (Polar; Caracas, Venezuela) fueron lavadas dos veces con 10 amortiguador de fosfato de potasio 25 mM, pH 7.5 (amortiguador A), se suspendieron en el mismo amortiguador y se rompieron por medio de perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro) en un Desintegrator-S (IMAO) a 3000 rpm durante 10 minutos. Los homogeneizados celulares fueron 15 centrifugados a 10,000 g durante 40 minutos, y el sobrenadante (fracción citosólica) fue utilizada para la

purificación de las actividades de la ~~o~~ o reductasa dependiente de NADPH.

Las enzimas fueron purificadas mediante cromatografías de columna sucesivas en un Sistema FPLC (Pharmacia), como se resume en la Figura 7. Todos los procedimientos fueron efectuados a 5°C.

La fracción citosólica fue aplicada a una columna DEAE-Sepharosa previamente equilibrada con amortiguador A. La columna se lavó primero con el mismo amortiguador y luego con el amortiguador A conteniendo KCl 250 mM y 500 mM, y la actividad enzimática fue eluida como dos picos. El primer pico (Reductasa 1) fue eluido con el amortiguador de lavado, y el segundo (Reductasa 2) fue eluido con el amortiguador que contenía KCl 250 mM. Ambas fracciones fueron almacenadas de manera separada y se precipitaron mediante la adición de sulfato de amonio. La Reductasa 1 fue precipitada con sulfato de amonio para dar un 50% de saturación, la mezcla fue agitada durante 30 minutos a 5°C y luego centrifugada durante 20 minutos a 4360 g. El sobrenadante resultante se llevó a una saturación de 90% de sulfato de amonio, se agitó durante 30 minutos, y se centrifugó durante 20 minutos a 4360 g. La Reductasa 2 fue precipitada con sulfato de amonio para dar 80% de saturación y se procesó como se describió anteriormente. Los puntos celulares obtenidos después de esta centrifugación fueron resuspendidos de manera separada en



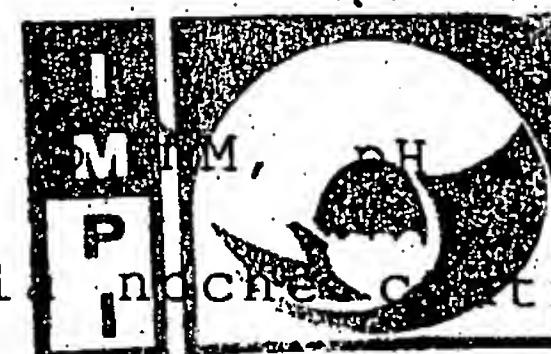
INSTITUTO
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

una cantidad mínima de fosfato de potasio (amortiguador B) y se dializó durante toda la noche contra el mismo amortiguador.

Las fracciones de enzima dializadas fueron 5 manera separada a columnas idénticas CM-Sephadex, previamente equilibradas con amortiguador B. En ambos casos, la actividad de reductasa no interactuó con la resina y las proteínas fueron eluidas con el amortiguador de equilibrio. Las fracciones con actividad de reductasa fueron almacenadas y concentradas mediante ultrafiltración 10 con una membrana Amicon YM-10.

Las fracciones de enzima recuperadas se adsorbieron entonces, de manera separada, a columnas idénticas Cibacron Blue previamente equilibradas con fosfato de potasio 25 mM, 15 pH 7.0 (amortiguador C). La Reductasa 1 fue eluida con el amortiguador que contenía KCl 400 mM, mientras que la Reductasa 2 fue eluida con un gradiente de KCl de 0 a 1 M, en amortiguador C.

Las fracciones que mostraron actividad de reductasa fueron recuperadas de manera separada y se concentraron a un volumen de 2 ml, como se describió anteriormente. La Reductasa 1 fue aplicada a una columna Red Sepharosa previamente equilibrada con amortiguador C y se eluyeron con un gradiente lineal de KCl de 0 a 1 M, en amortiguador C, mientras que la Reductasa 2 fue aplicada a una columna de Superosa 12 equilibrada con el mismo amortiguador.





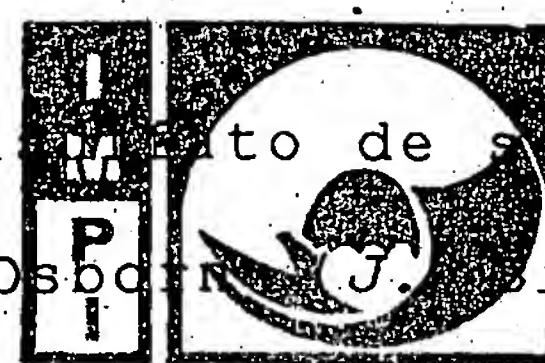
Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

Como última etapa de purificación, ambas preparaciones enzimáticas (Reductasa 1 y Reductasa 2) fueron sometidas a una columna preparativa de fase inversa. La Reductasa 1 fue aplicada a una columna ProRPC (Pharmacia), mientras que la Reductasa 2 fue aplicada a una columna Resource RPC de 1 ml (Pharmacia Biotech). Ambas columnas se conectaron separadamente a un sistema HPLC Plus, LC Module I, de Waters. La elución de proteína fue monitoreada midiendo la absorbancia a 215 nm, y los picos que contenían proteína se recolectaron de manera separada. Las enzimas purificadas se secaron por congelación y se almacenaron a -70°C.

Las actividades de las enzimas reductasas de oxoaldehído, aisladas y purificadas, fueron determinadas en una mezcla que contenía metilglicoxal 9 mM, NADPH 0.1 mM, amortiguador de fosfato de potasio 25 mM (pH 7.0), y la fracción enzimática (8 µg aproximadamente) en un volumen total de 0.5 ml. La reacción fue monitoreada a 340 nm. Todos los ensayos se efectuaron a 25°C. Una unidad de la enzima fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 µmol de NADPH por minuto a 25°C.

Ejemplo 2: Caracterización Bioquímica de la Reductasa 1.

Las fracciones cromatográficas del Ejemplo 1, que mostraron actividad enzimática, fueron utilizadas para estimar el peso molecular tanto por cromatografía de filtración en gel y por electroforésis en gel de

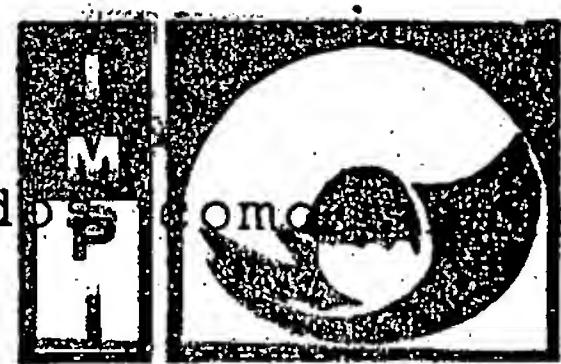


poliacrilamida 12.5%, que contenía dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) como se describe por Weber y Osborn (J. Biol. Chem. 244:4406-4412 (1960)). La proteína fue determinada por el método de Lowry et al. (J. Biol. Chem. 193:265-275 (1951)), usando albúmina de suero bovino como estandar.

La filtración analítica en gel, en HPLC, fue efectuada en una columna de Sephacryl S-200 (Waters), que fue equilibrada y eluida con el amortiguador C. Ambas enzimas eluyeron como picos únicos; el peso molecular de la 10 Reductasa 1 natural, determinado por este método, se mostró que era de 86 kDa. Sin embargo, el análisis de la Reductasa 1 por SDS-PAGE mostró una única banda con peso molecular de 44 kDa (Figura 8), mientras que una sola banda de 39.5 kDa fue obtenida para la Reductasa 2 (Figura 9).

15 El gel de poliacrilamida que contenía la Reductasa 1 fue explorado utilizando una cámara (UVP), y la imagen digital fue evaluada mediante un programa de cómputo (GelWorks, UVP). Este análisis densitométrico mostró que la Reductasa 1 estaba purificada cerca de la homogeneidad 20 (96%) como una única banda del peso molecular adecuado.

La enzima Reductasa 1 purificada fue secuenciada parcialmente por el método de degradación de Edman (Edman, P., Acta. Chem. Scan., 4:483 (1950)) usando un instrumento ProSequencer MilliGen/Bioscience, identificándose los 25 derivados de aminoácidos en línea después de cada ciclo de degradación. Los primeros 30 residuos de aminoácidos de



esta Reductasa 1 purificada fueron encontrados como:

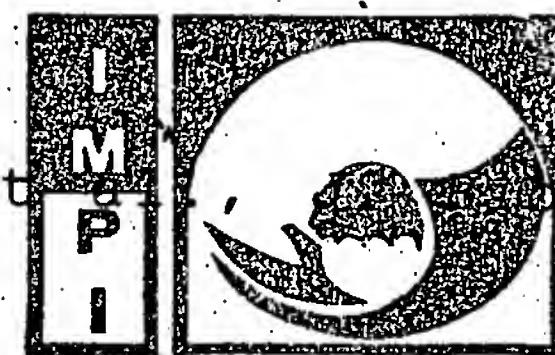
MPFVKDFKPQALGDTNLFKPIKIGNNELLH (SEQ ID NO: 4)

Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

Ejemplo 3: Identificación y Clonación de la Oxidoreductasa

5 OYE2 de la Levadura de Cerveza.

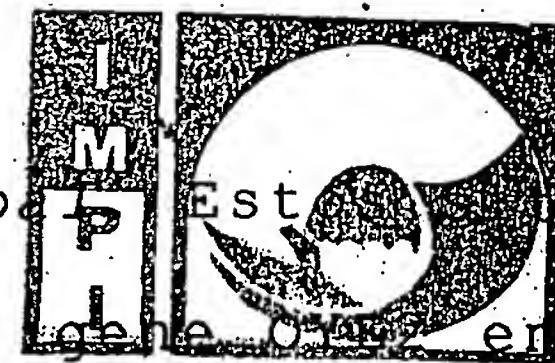
La identificación de la Reductasa 1 de la levadura se logró mediante su purificación bioquímica a partir de la levadura de cerveza, como en el Ejemplo 1, y por su secuenciación de aminoácidos N-terminales, como en el 10 Ejemplo 2. Los primeros 30 residuos de aminoácidos de la proteína (SEQ ID NO: 4) revelaron que estaba relacionada con una reductasa bien conocida llamada Vieja Enzima Amarilla (OYE; EC 1.6.99.1) (Warburg, O., y Christian, W., *Biochem. Z.* 266:377-411 (1993)). Esta enzima fue 15 caracterizada por primera vez a partir de la levadura de cerveza *Saccharomyces carlsbergensis*, con un peso molecular aparente de 45 kDa en SDS-PAGE y con una actividad enzimática característica de una oxidoreductasa dependiente de NADPH. Los genes correspondientes para las tres 20 isoenzimas OYE separadas, OYE1, OYE2 y OYE3, fueron clonados posteriormente, secuenciados y expresados en *E. coli*, y se reportaron las secuencias de aminoácidos completas para cada una (OYE1: SEQ ID NO: 1, Saito, K., et al., *J. Biol. Chem.* 266:20720-20724 (1991); OYE2: SEQ ID 25 NO: 2, Stott, K., et al., *J. Biol. Chem.* 268:6097-6106



(1993); OYE3: SEQ ID NO: 3, Niino, Y. S., et al. ¹ ^{fue} ^{1.}
Chem. 270:1983-1991 (1995)).

En los presentes estudios, la Reductasa ¹ ^{fue} ^{de los primeros 30} ⁵ residuos de aminoácidos de la proteína contra la Base de Datos del Genoma de *Saccharomyces*, SGD, mediante la Red Mundial (World Wide Web) (Cherry, J. et al., Base de Datos del Genoma de *Saccharomyces*, que se encuentra disponible vía Internet en <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>). Esta comparación de secuencias mostró, sin ambigüedad, que la Reductasa 1 presentaba 100% de homología con OYE2, 91% de homología con OYE1 y 81% de homología con OYE3, donde todas las enzimas fueron aisladas de la levadura del género *Saccharomyces*.

La secuencia de ADN del gene de OYE2, de *Saccharomyces cerevisiae*, fue recuperada del SGD (GenBank Adquisición No. L06124), y después de un análisis de secuencia del ADN se diseñaron dos secuencias cebadoras que fueron capaces de amplificar específicamente el gene del genoma de la levadura de cerveza vía PCR. Las secuencias cebadoras PCR (Secuencia cebadora hacia adelante: 5'-GGA ATT CAT GCC ATT TGT TAA GGA C-3' (SEQ ID NO: 5); Secuencia cebadora inversa: 5'-CTC TAG ATT AGA GCT TCT TCG TAC G-3' (SEQ ID NO: 6)) comprendían, además, los sitios de la secuencia de reconocimiento para *EcoRI* (término 5') y *XbaI* (término 3'), de modo que los productos PCR fueron sintetizados con



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

sitos de restricción terminales *EcoRI* y *XbaI*. Estos sitios de restricción permitieron la clonación del gene *OYE2* en la estructura hacia pProEx-Hta (Life Technologies Inc.; Rockville, Maryland).

Después de la caracterización de la enzima de restricción, el gene amplificado de *OYE2* fue subclonado en el vector de expresión pProEx-Hta para formar el plásmido pProExOYE2. Las células huésped de *E. coli* K (cepas XLI-blue, JM109 o DH5 α) fueron entonces transformadas con este plásmido.

Las bacterias recombinantes fueron tamizadas en placas de agar LB que contenían 100 μ g/ml de ampicilina, y las bacterias resistentes a la ampicilina fueron evaluadas posteriormente aislando sus plásmidos mediante métodos bien conocidos (Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a Ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (1989)). Las bacterias recombinantes positivas que llevaban el plásmido pProEx-OYE2 fueron inducidas con 600 μ M de IPTG durante 3 horas para expresar el polipéptido de fusión esperado de 52 kDa. La proteína recombinante representaba aproximadamente 18% de las proteínas bacterianas totales y se purificó adicionalmente por medio de cromatografía de afinidad, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, para la expresión del sistema pProEx.

Ejemplo 4: Ensayos de Especificidad del Sustrato.



Se ensayaron diversos compuestos de carbono como sustratos para las enzimas reductasas aisladas y purificadas. Como se muestra en la Figura 10 de la Propiedad Industrial 5. 1 y la Reductasa 2 actuaron sobre los 2-oxoaldehídos como el metilglicoxal y la 3-desoxiglucosona. La Reductasa 1 mostró mayor actividad que la Reductasa 2 sobre los compuestos con un solo grupo ceto o aldo como el acetaldehido y el piridin-3-aldehido. Se encontró que el 10 glucouronato es un mejor sustrato para la Reductasa 2 que para la Reductasa 1, mientras que la metirapona fue un sustrato aceptable para las dos enzimas. Ambas reductasas mostraron poco o ningún efecto sobre las aldosas ensayadas (glucosa, galactosa y xilosa). Es notable que ninguna 15 enzima mostró ninguna actividad apreciable sobre el piruvato.

Estos resultados demuestran que la Reductasa 1 y la Reductasa 2 son química y cinéticamente diferentes.

20 **Ejemplo 5: Efecto de las Reductasas sobre LC18.**

Con el fin de determinar el efecto de ambas reductasas en la intensidad del pico de LC18, 1 ml de una mezcla de cerveza fresca, amortiguador de fosfato de potasio 25 mM (pH 7.0), NADPH 0.1 mM y el volumen requerido de la enzima, 25 para obtener una concentración final en la solución de 50 unidades/ml de enzima, fue incubado a 25°C durante 30

minutos. Despues de la incubación, la cerveza tratada fue analizada sobre una columna Aminex HPX-87H conectada a un sistema HPLC de Waters, bajo las condiciones detalladas anteriormente.

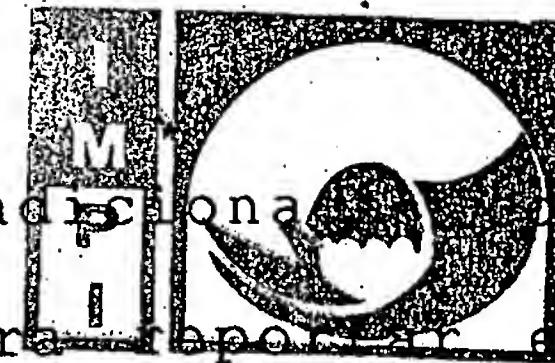


Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

5 Como se demostró en la Figura 11, el tratamiento de la cerveza con la Reductasa 1 o la Reductasa 2, originó una reducción importante en el área del pico de LC18 (flechas), con respecto al de una cerveza control no tratada. El tratamiento de la cerveza con la Reductasa 1 indujo una 10 mayor reducción en el pico de LC18 que el tratamiento con la Reductasa 2, quizás reflejando la mayor actividad específica de la primera para diversos sustratos con un solo grupo ceto-carbonilo o aldo-carbonilo, como se muestra en la Figura 10. Estos resultados demuestran que el 15 tratamiento con cualquiera de las enzimas, Reductasa 1 o Reductasa 2, y preferiblemente con la Reductasa 1, pueden reducir la formación de los indices del sabor descompuesto, como LC18, en la cerveza fresca.

20 Ejemplo 6: Evaluación del Sabor.

Para las evaluaciones sensoriales del sabor en la cerveza, utilizamos un panel de seis catadores entrenados. Se pidió a cada participante comparar los perfiles de sabor y determinar la presencia o ausencia de componentes del 25 sabor asociados con el grado de frescura de la cerveza en las siguientes muestras: 1) cerveza fresca a 5°C; 2)



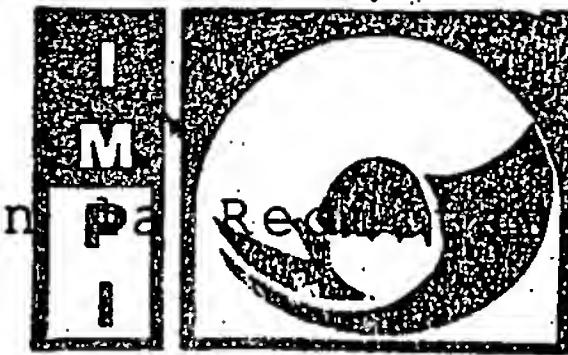
cerveza control a 28°C; y 3) cerveza adicionada con Reductasa 1 a 28°C. La escala utilizada para evaluar el grado de frescura de la cerveza fue de "1" a "5" (1 indicando el sabor más fresco).

Las cervezas se prepararon como se indica enseguida:

1) Cervezas Control: se tomaron 10 ml de cerveza de cada una de seis botellas de cerveza gresca, pasteurizada, bajo una corriente de CO₂. Este volumen fue reemplazado con 6 ml del amortiguador C y 4 ml de NADPH 3 mM, y las 10 botellas se taparon otra vez. Tres botellas fueron almacenadas a 5°C durante 15 días y las otras tres a 28°C durante 15 días.

2) Cervezas Experimentales: se tomaron 10 ml de cerveza de cada una de tres botellas de 222 ml de cerveza fresca, pasteurizada, bajo una corriente de CO₂, y este volumen fue reemplazado con 5.4 ml del amortiguador A, 4 ml de NADPH 3 mM y 0.6 ml de Reductasa 1. Las botellas se taparon otra vez y se almacenaron a 28°C durante 15 días.

Las cervezas control, fresca, y experimental se sometieron entonces a la evaluación por el panel de catadores. Como se muestra en la Figura 12, estas pruebas de evaluación del sabor demostraron un importante incremento en el grado de frescura en las cervezas que contenían Reductasa 1, comparadas con las cervezas control a 28°C. Junto con los resultados de la evaluación cromatográfica, mencionada anteriormente, estos resultados



indican que el tratamiento de la cerveza con Pa Reducta 1 estabiliza el sabor de la cerveza.

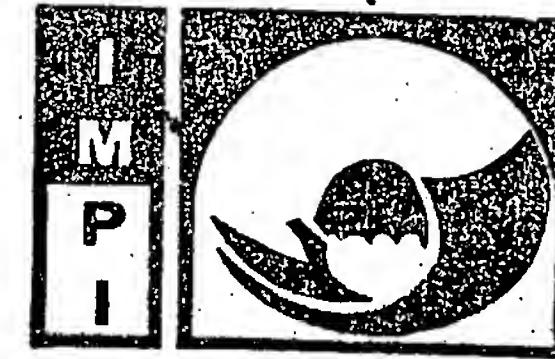
Instituto

Mexicano
de la Propiedad
Industrial

Habiéndose ahora descrito completamente la invención, en cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad en la comprensión, será obvio para cualquiera entrenado en la técnica que lo mismo puede efectuarse modificando o cambiando la invención dentro de un amplio y equivalente intervalo de condiciones, formulaciones, y otros parámetros, sin afectar el alcance de la invención o cualquier modalidad específica de la misma, y que estas modificaciones o cambios pretendan ser abarcados dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación son indicativas del nivel de desarrollo de los entrenados en la técnica, a los cuales pertenece esta invención, y se incorporan aquí como referencia al mismo grado como si cada publicación, patente o solicitud de patente individual indicara específicamente individualmente que fuera incorporada como referencia.

LISTADO DE LA SECUENCIA



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

<110> Rangel-AlDAO, Rafael
Bravo, Adriana
Sánchez, Beatriz
Galindo-Castro, Ivan

5 <120> Bebida de Malta con Sabor Estabilizado y Métodos de Producción
de la Misma.

<130> 1390.007MX03

<140>

10 <141> 1998-09-09

<150> 60/058,398

<151> 1997-09-09

15 <160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

20 <211> 400

<212> PRT

<213> *Saccharomyces carlsbergensis*

<400> 1

Met Ser Phe Val Lys Asp Phe Lys Pro Gln Ala Leu Gly Asp Thr Asn
1 5 10 15

Leu Phe Lys Pro Ile Lys Ile Gly Asn Asn Glu Leu Leu His Arg Ala
20 25 30

Val Ile Pro Pro Leu Thr Arg Met Arg Ala Leu His Pro Gly Asn Ile
35 40 45

Pro Asn Arg Asp Trp Ala Val Glu Tyr Tyr Gln Arg Ala Gln Arg
50 55 60

Pro Gly Thr Met Ile Ile Thr Glu Gly Ala Phe Ile Ser Pro Gln Ala
65 70 75 80

Gly Gly Tyr Asp Asn Ala Pro Gly Val Trp Ser Glu Glu Gln Met Val
85 90 95

Glu Trp Thr Lys Ile Phe Asn Ala Ile His Glu Lys Lys Ser Phe Val
100 105 110

Trp Val Gln Leu Trp Val Leu Gly Trp Ala Ala Phe Pro Asp Asn Leu
115 120 125

Ala Arg Asp Gly Leu Arg Tyr Asp Ser Ala Ser Asp Asn Val Phe Met
130 135 140

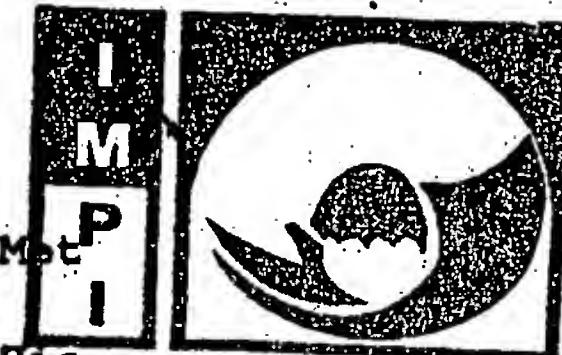
Asp Ala Glu Gln Glu Ala Lys Ala Lys Lys Ala Asn Asn Pro Gln His
145 150 155 160

Ser Leu Thr Lys Asp Glu Ile Lys Gln Tyr Ile Lys Glu Tyr Val Gln
 165 170 175
 Ala Ala Lys Asn Ser Ile Ala Ala Gly Ala Asp Gly Val Glu Ile His
 180 185 190 195
 Ser Ala Asn Gly Tyr Leu Leu Asn Gln Phe Leu Asp Pro His Ser Asp
 195 200 205
 Thr Arg Thr Asp Glu Tyr Gly Gly Ser Ile Glu Asn Arg Ala Arg P
 210 215 220
 Thr Leu Glu Val Val Asp Ala Leu Val Glu Ala Ile Gly His
 225 230 235 240
 Val Gly Leu Arg Leu Ser Pro Tyr Gly Val Phe Asn Ser Met Ser Gly
 245 250 255
 Gly Ala Glu Thr Gly Ile Val Ala Gln Tyr Ala Tyr Val Ala Gly Glu
 260 265 270
 Leu Glu Lys Arg Ala Lys Ala Gly Lys Arg Leu Ala Phe Val His Leu
 275 280 285
 Val Glu Pro Arg Val Thr Asn Pro Phe Leu Thr Glu Gly Glu Gly
 290 295 300
 Tyr Glu Gly Gly Ser Asn Asp Phe Val Tyr Ser Ile Trp Lys Gly Pro
 305 310 315 320
 Val Ile Arg Ala Gly Asn Phe Ala Leu His Pro Glu Val Val Arg Glu
 325 330 335
 Glu Val Lys Asp Lys Arg Thr Leu Ile Gly Tyr Gly Arg Phe Phe Ile
 340 345 350
 Ser Asn Pro Asp Leu Val Asp Arg Leu Glu Lys Gly Leu Pro Leu Asn
 355 360 365
 Lys Tyr Asp Arg Asp Thr Phe Tyr Gln Met Ser Ala Trp Gly Tyr Ile
 370 375 380
 Asp Tyr Pro Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Lys Leu Gly Trp Asp Lys Lys
 385 390 395 400

Instituto
 Mexicano
 de la Propiedad
 Industrial

<210> 2
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces carlsbergensis*

<400> 2
 Met Pro Phe Val Lys Asp Phe Lys Pro Gln Ala Leu Gly Asp Thr Asn
 1 5 10 15
 Leu Phe Lys Pro Ile Lys Ile Gly Asn Asn Glu Leu Leu His Arg Ala
 20 25 30
 Val Ile Pro Pro Leu Thr Arg Met Arg Ala Gln His Pro Gly Asn Ile
 35 40 45
 Pro Asn Arg Asp Trp Ala Val Glu Tyr Tyr Ala Gln Arg Ala Gln Arg
 50 55 60
 Pro Gly Thr Leu Ile Ile Thr Glu Gly Thr Phe Pro Ser Pro Gln Ser
 65 70 75 80
 Gly Gly Tyr Asp Asn Ala Pro Gly Ile Trp Ser Glu Glu Gln Ile Lys
 85 90 95
 Glu Trp Thr Lys Ile Phe Lys Ala Ile His Glu Asn Lys Ser Phe Ala
 100 105 110
 Trp Val Gln Leu Trp Val Leu Gly Trp Ala Ala Phe Pro Asp Thr Leu



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

115	120	125
Ala Arg Asp Gly Leu Arg Tyr Asp Ser Ala Ser Asp Asn Val Tyr Met		
130	135	140
Azn Ala Glu Gln Glu Glu Lys Ala Lys Lys Ala Asn Asn Pro Gln His		
145	150	155
Ser Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Gin Tyr Val Lys Glu Tyr Val Gln		
165	170	175
Ala Ala Lys Asn Ser Ile Ala Ala Gly Ala Asp Gly Val Glu Ile		
180	185	190
Ser Ala Asn Gly Tyr Leu Leu Asn Gln Phe Leu Asp Pro His Ser Asn		
195	200	205
Asn Arg Thr Asp Glu Tyr Gly Gly Ser Ile Glu Asn Arg Ala Arg Phe		
210	215	220
Thr Leu Glu Val Val Asp Ala Val Val Asp Ala Ile Gly Pro Glu Lys		
225	230	235
Val Gly Leu Arg Leu Ser Pro Tyr Gly Val Phe Asn Ser Met Ser Gly		
245	250	255
Gly Ala Glu Thr Gly Ile Val Ala Gln Tyr Ala Tyr Val Leu Gly Glu		
260	265	270
Leu Glu Arg Arg Ala Lys Ala Gly Lys Arg Leu Ala Phe Val Val His Leu		
275	280	285
Val Glu Pro Arg Val Thr Asn Pro Phe Leu Thr Glu Gly Glu Gly Glu		
290	295	300
Tyr Asn Gly Gly Ser Asn Lys Phe Ala Tyr Ser Ile Trp Lys Gly Pro		
305	310	315
Ile Ile Arg Ala Gly Asn Phe Ala Leu His Pro Glu Val Val Arg Glu		
325	330	335
Glu Val Lys Asp Pro Arg Thr Leu Ile Gly Tyr Gly Arg Dhe Phe Ile		
340	345	350
Ser Asn Pro Asp Leu Val Asp Arg Leu Glu Lys Gly Leu Pro Leu Asn		
355	360	365
Lys Tyr Asp Arg Asp Thr Phe Tyr Lys Met Ser Ala Glu Gly Tyr Ile		
370	375	380
Asp Tyr Pro Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Lys Leu Gly Trp Asp Lys Asn		
385	390	395
		400

<210> 3

<211> 400

<212> PRT

<213> *Saccharomyces carlsbergensis*

<400> 3

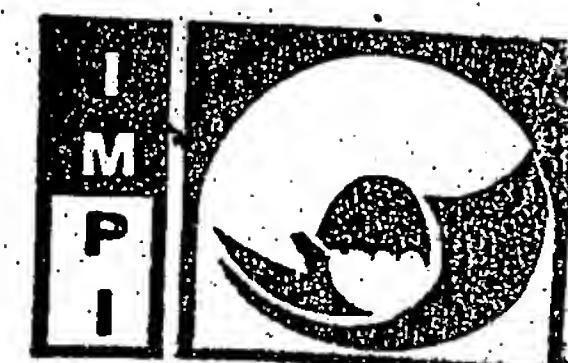
Met Pro Phe Val Lys Gly Phe Glu Pro Ile Ser Leu Arg Asp Thr Asn			
1	5	10	15
Leu Dhe Glu Pro Ile Lys Ile Gly Asn Thr Gln Leu Ala His Arg Ala			
20	25	30	
Val Met Pro Pro Leu Thr Arg Met Arg Ala Thr His Pro Gly Asn Ile			
35	40	45	
Dhe Asn Lys Glu Trp Ala Ala Val Tyr Tyr Gly Gln Arg Ala Gln Arg			
50	55	60	

Pro Gly Thr Met Ile Ile Thr Glu Gly Thr Phe Ile Ser Pro Val Ile
 65 70 75
 Gly Gly Tyr Asp Asn Ala Pro Gly Ile Trp Ser Asp Glu Cln Val Ile
 85 90
 Glu Trp Lys Asn Ile Phe Leu Ala Ile His Asp Cys Gln Ser Phe Ala **Instituto**
 100 105 110
 Trp Val Gln Leu Trp Ser Leu Gly Trp Ala Ser Phe Pro Asp Val Leu
 115 120 125
 Ala Arg Asp Gly Leu Arg Tyr Asp Cys Ala Ser Asp Arg Val Tyr Met **Industrial**
 130 135 140
 Asn Ala Thr Leu Gln Glu Lys Ala Lys Asp Ala Asn Asn Leu Glu His
 145 150 155 160
 Ser Leu Thr Lys Asp Asp Ile Lys Gln Tyr Ile Lys Asp Tyr Ile His
 165 170 175
 Ala Ala Lys Asn Ser Ile Ala Ala Gly Ala Asp Gly Val Glu Ile His
 180 185 190
 Ser Ala Asn Gly Tyr Leu Leu Asn Gln Phe Leu Asp Pro His Ser Asn
 195 200 205
 Lys Arg Thr Asp Glu Tyr Gly Thr Ile Glu Asn Arg Ala Arg Phe
 210 215 220
 Thr Leu Glu Val Val Asp Ala Leu Ile Glu Thr Ile Gly Pro Glu Arg
 225 230 235 240
 Val Gly Leu Arg Leu Ser Pro Tyr Gly Thr Phe Asn Ser Met Ser Gly
 245 250 255
 Gly Ala Glu Pro Gly Ile Ile Ala Gln Tyr Ser Tyr Val Leu Gly Glu
 260 265 270
 Leu Glu Lys Arg Ala Lys Ala Gly Lys Arg Leu Ala Phe Val His Leu
 275 280 285
 Val Glu Pro Arg Val Thr Asp Pro Ser Leu Val Glu Gly Glu Gly Glu
 290 295 300
 Tyr Ser Glu Gly Thr Asn Asp Phe Ala Tyr Ser Ile Trp Lys Gly Pro
 305 310 315 320
 Ile Ile Arg Ala Gly Asn Tyr Ala Leu His Pro Glu Val Val Arg Glu
 325 330 335
 Gln Val Lys Asp Pro Arg Thr Leu Ile Gly Tyr Gly Arg Phe Phe Ile
 340 345 350
 Ser Asn Pro Asp Leu Val Tyr Arg Leu Glu Glu Gly Leu Pro Leu Asn
 355 360 365
 Lys Tyr Asp Arg Ser Thr Phe Tyr Thr Met Ser Ala Glu Gly Tyr Thr
 370 375 380
 Asp Tyr Pro Thr Tyr Glu Glu Ala Val Asp Leu Gly Trp Asn Lys Asn
 385 390 395 400



<210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces carlsbergensis*

<400> 4
 Met Pro Phe Val Lys Asp Phe Lys Pro Cln Ala Leu Gly Asp Thr Asn
 1 5 10 15
 Leu Phe Lys Pro Ile Lys Ile Gly Asn Asn Glu Leu Leu His



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

<210> 5
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
sintético.

10 <400> 5

ggaattcattg ccatttggta aggac

<210> 6

15 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial.

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
sintético

<400> 6

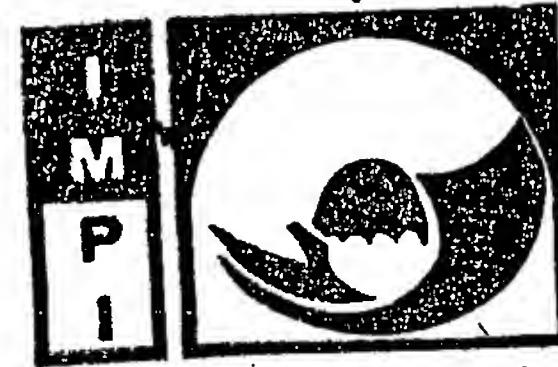
ctcttagatta gagcttcttc gtacg



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

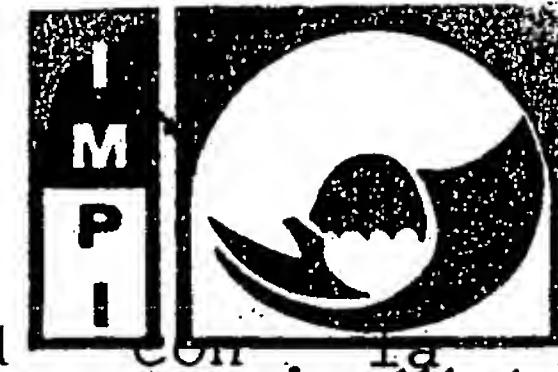
Se hace constar que, con relación a este ~~fe~~ mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención es el convencional manufacture de los objetos o sustancias a que la ~~misma~~ 5 refiere.

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes.

REIVINDICACIONES

Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

1. Una composición caracterizada porque comprende un grano de malta o mosto de grano de malta y una célula de levadura modificada genéticamente que producen cantidades mejoradas de por lo menos una enzima reductasa nativa para células de levadura comparadas con células de la cepa de tipo salvaje de la célula de levadura, las células tipo salvaje producen cantidades medibles de la enzima reductasa, en donde la enzima reductasa se selecciona del grupo que consiste en OYE1 que tiene una secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO:1, OYE2 que tiene una secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO:2 y OYE3 que tiene una secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO:3.
- 15 2. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la célula de levadura es una célula *Saccharomyces spp.*
- 20 3. La composición de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque la célula de levadura es una célula *Saccharomyces cerevisiae* o una *Saccharomyces carlsbergensis*.



4. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la enzima reductasa OYE2 que tiene una secuencia de aminoácido establecida en la ID NO:2.

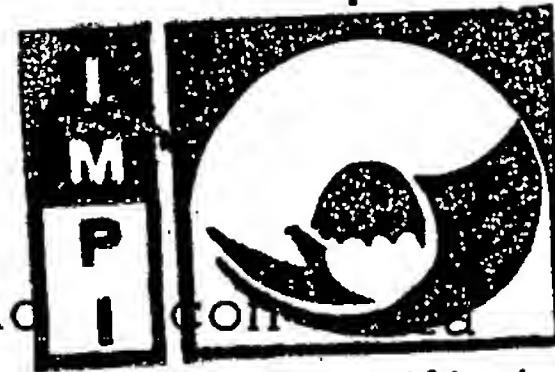
5

5. Una composición caracterizada porque comprende un grano de malta o mosto de grano de malta y por lo menos una enzima reductasa recombinante, en donde la enzima reductasa recombinante se selecciona del grupo que consiste 10 en OYE1 que tiene una secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO:1, OYE2 que tiene una secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO:2 y OYE3 que tiene una secuencia de aminoácido establecida en SEQ ID NO:3.

15 6. La composición de conformidad con la
reivindicación 5, caracterizada porque la enzima reductasa
recombinante se produce en una célula huésped de levadura.

7. La composición de conformidad con la
20 reivindicación 6, caracterizada porque la célula huésped de
levadura es una célula *Saccharomyces*.

8. La composición de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque la enzima reductasa recombinante se produce en una célula huésped bacterial.



9. La composición de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque la célula huésped bacterial se selecciona del grupo que consiste en una célula huésped *Escherichia*, una célula huésped *Bacillus* y una célula huésped *Xanthomonas*.

10. La composición de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque la enzima reductasa recombinante se produce en una célula huésped animal.

10

11. La composición de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada porque la célula huésped animal es una célula de insecto.

15

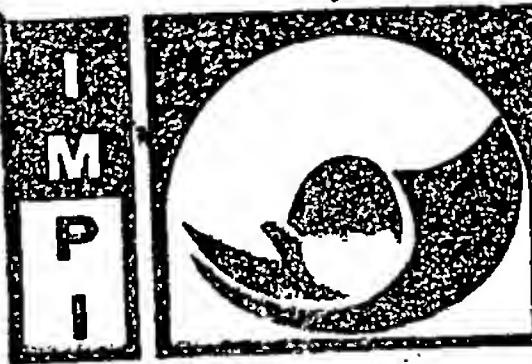
12. Un método para estabilizar el sabor de una bebida de malta fermentada caracterizado porque comprende contactar la bebida con una cantidad estabilizadora de sabor de una o más enzimas reductasa que tienen la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3.

20

13. Un método para producir una bebida de malta fermentada procesada, el método se caracteriza porque comprende:

25

a) producir una malta de grano;



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

b) producir un mosto de la malta de grano;

c) fermentar el mosto para producir una bebida de
malta fermentada;

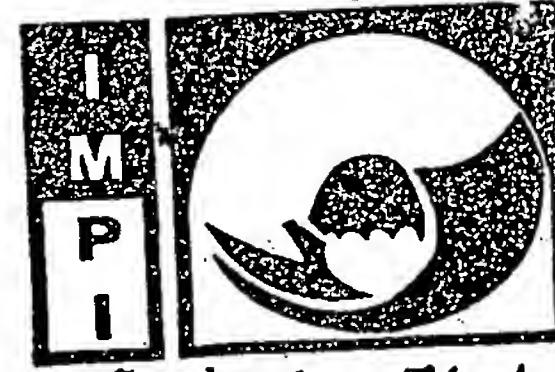
d) procesar la bebida de malta fermentada para
5 producir una bebida de malta fermentada procesada; y

e) empacar la bebida de malta fermentada procesada,
en donde una cantidad estabilizadora de sabor de una o más
enzimas reductasa que tienen la secuencia de aminoácido
seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID
10 NO:2 y SEQ ID NO:3 se añade a una o más de: la malta
producida en a), el mosto producido en b), la bebida de malta
fermentada producida en c), la bebida de malta fermentada
procesada producida en d), y la bebida empacada producida en
e).

15 14. El método de conformidad con la reivindicación
13, caracterizado porque la enzima reductasa se añade al
mosto antes de la etapa de fermentación.

20 15. El método de conformidad con la reivindicación
13, caracterizado porque la enzima reductasa se añade a la
bebida de malta fermentada antes de la etapa de
procesamiento.

25 16. El método de conformidad con la reivindicación



13, caracterizado porque la enzima reductasa se añade a la bebida de malta fermentada procesada antes de la etapa de empaque.

5 17. El método de conformidad con la reivindicación
12 o reivindicación 13, caracterizado porque la enzima
reductasa se inmoviliza sobre un soporte sólido.

10 18. El método de conformidad con la reivindicación
17, caracterizado porque el soporte sólido comprende además
NADPH.

15 19. El método de conformidad con la reivindicación
12 o reivindicación 13, caracterizado porque la enzima
reductasa se purifica.

20 20. El método de conformidad con la reivindicación
12 o reivindicación 13, caracterizado porque la bebida de
malta fermentada es cerveza.

21 21. El método de conformidad con la reivindicación
12 o reivindicación 13, caracterizado porque la enzima
reductasa se aísla de la célula de levadura.

25 22. El método de conformidad con la reivindicación
21, caracterizado porque la célula de levadura es una célula



Saccharomyces spp.

23. El método de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque la célula de levadura es una célula *Saccharomyces*

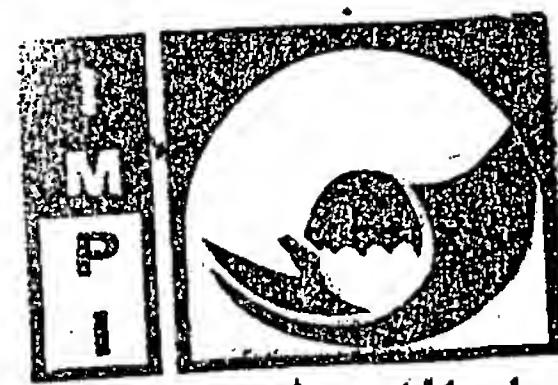
5 *Saccharomyces cerevisiae* o una célula *Saccharomyces carlsbergensis*.

24. El método de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque la célula de levadura ha sido 10 modificada genéticamente para permitir la producción mejorada de una o más de las enzimas reductasa relativa a la producción en una célula de levadura no modificada.

25. Un método para producir una bebida de malta fermentada que tiene un sabor estabilizado, el método 15 caracterizado porque comprende:

a) producir una malta de grano;
b) producir un mosto de la malta de grano; y
c) fermentar el mosto para producir una bebida de 20 malta fermentada que tiene sabor estabilizado,

en donde una cantidad estabilizadora de sabor de una o más enzimas reductasa que tiene una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3 se añade a una o más de: la 25 malta producida en a), el mosto producido en b) y la bebida



de malta fermentada producida en c).

26. Un método para producir una bebida de malta fermentada que tiene sabor estabilizado, el método

5 caracteriza porque comprende:

a) producir una malta de grano;

b) producir un mosto de la malta de grano;

c) poner en contacto el mosto con la célula

Saccharomyces spp modificada genéticamente que secreta

10 cantidades mejoradas de una o más enzimas reductasa,

relativas a las cantidades de las enzimas reductasa

secretadas en la cepa de tipo salvaje de la célula, en donde

la una o más enzimas reductasa tiene una secuencia de

aminoácido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID

15 NO:1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3; y

d) permitir que la célula fermente el mosto, de tal modo produciendo una bebida de malta fermentada teniendo sabor estabilizado.

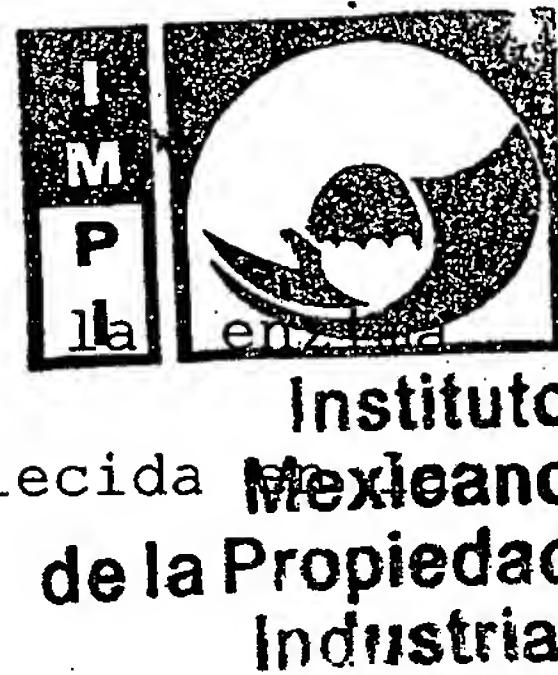
20 27. El método de conformidad con la reivindicación

25 o reivindicación 26, caracterizado porque la enzima

reductasa tiene la secuencia de aminoácido establecida en la

SEQ ID NO:1.

25 28. El método de conformidad con la reivindicación



25 o reivindicación 26, caracterizado porque la enzima
reductasa tiene la secuencia de aminoácido establecida en la
SEQ ID NO:2.

5 29. El método de conformidad con la reivindicación

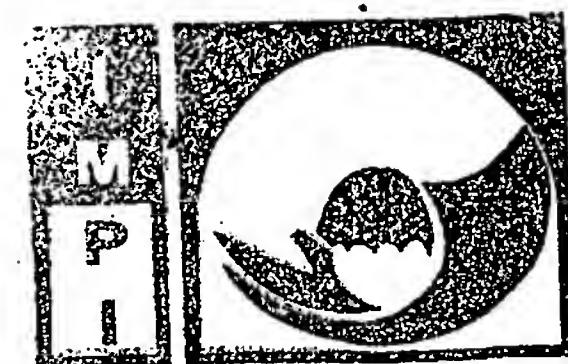
25 o reivindicación 26, caracterizado porque la enzima
reductasa tiene la secuencia de aminoácido establecida en la
SEQ ID NO:3.

10 30. El método de conformidad con la reivindicación

25, caracterizado porque la célula es una célula
Saccharomyces cerevisiae o una *Saccharomyces carlsbergensis*.

31. El método de conformidad con la reivindicación

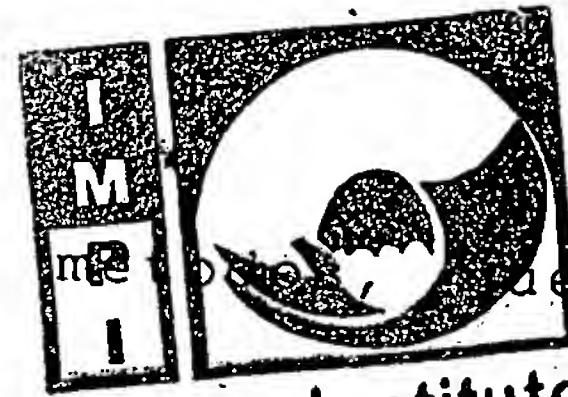
15 25 o reivindicación 26, caracterizado porque la bebida de
malta fermentada es una cerveza.



RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se dirige a un método para estabilizar el sabor de una bebida fermentada de malta, particularmente, una cerveza, mediante la adición de uno o más inhibidores, bloqueadores, agentes reductores o agentes de unión, que inactiven uno o más compuestos intermedios de la reacción de Maillard que inducen la descomposición del sabor de las bebidas fermentadas de malta. En estos métodos preferidos, los agentes utilizados son enzimas reductasas, especialmente reductasas de aldehído, reductasas de carbonilo, reductasas de aldosa, reductasas de oxoaldehido y, más particularmente, oxidoreductasas como las isoenzimas de la Vieja Enzima Amarilla (e.g., OYE1 y OYE2). La invención también se dirige a la bebida fermentada de malta que se prepara por este método, y al uso, durante el proceso de fabricación de la cerveza, de enzimas reductasas de fuentes naturales, incluyendo las producidas por las levaduras, para estabilizar el sabor de la cerveza resultante y producir una cerveza con un sabor estable. La invención también se relaciona con células que han sido modificadas específicamente, seleccionadas, o tratadas mediante ingeniería genética para expresar o secretar una enzima reductasa que pueda ser utilizada durante el proceso de fabricación de la cerveza para estabilizar el sabor del producto cervecero resultante y producir una cerveza con un sabor estable. La invención también proporciona bebidas

fermentadas de malta, producidas por estos
tienen una estabilidad reforzada del sabor.



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

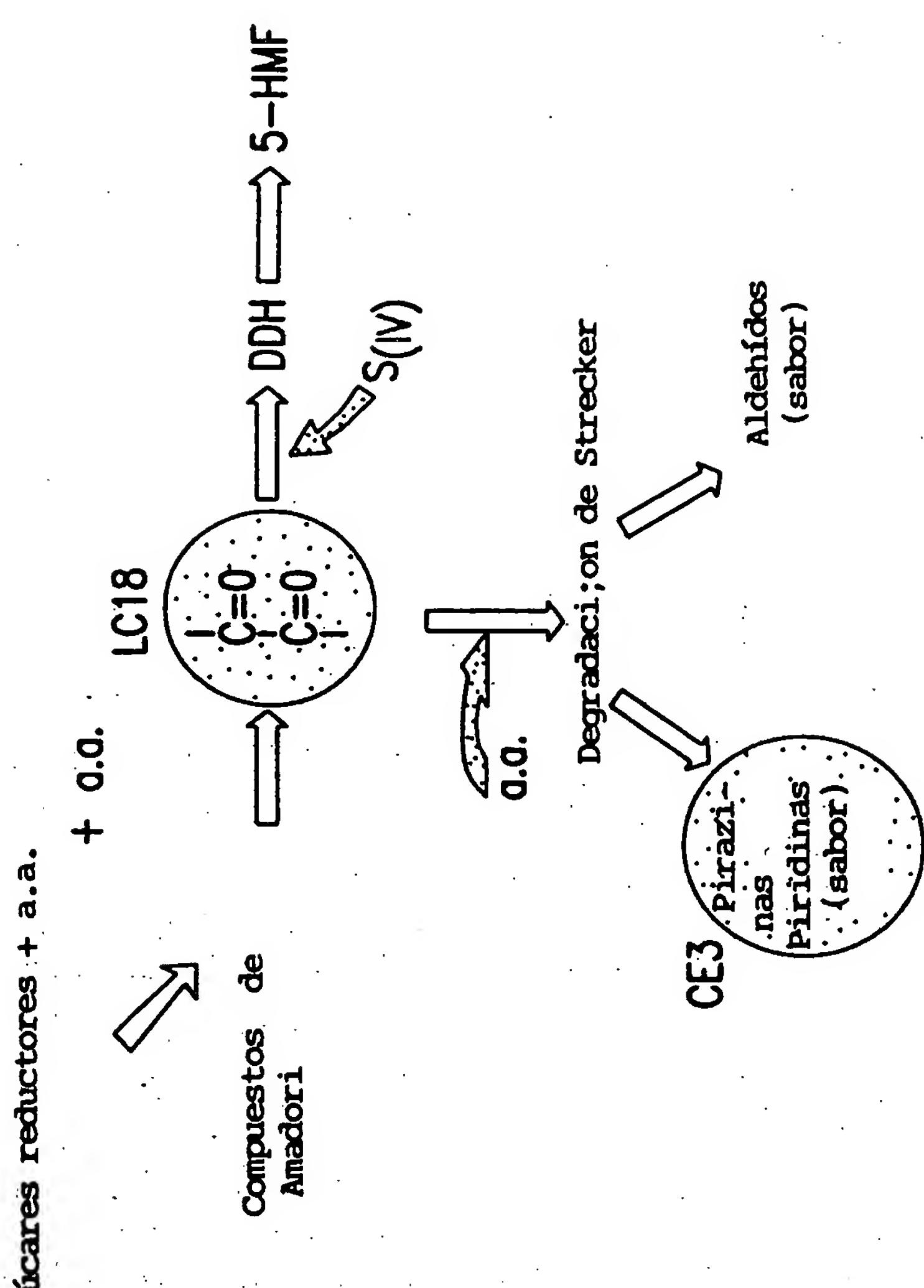
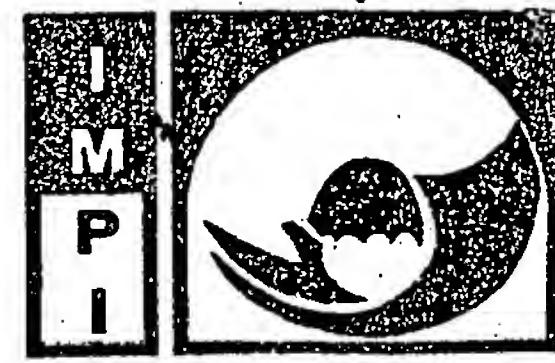
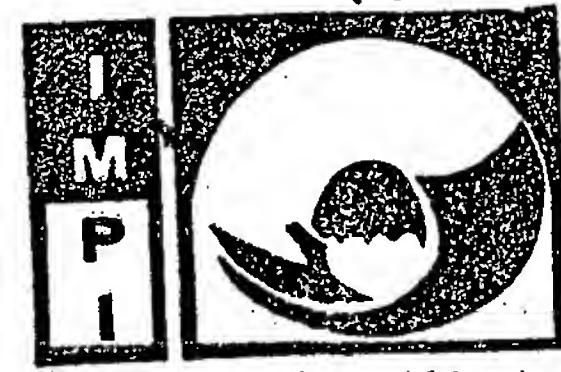


FIG. 1



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

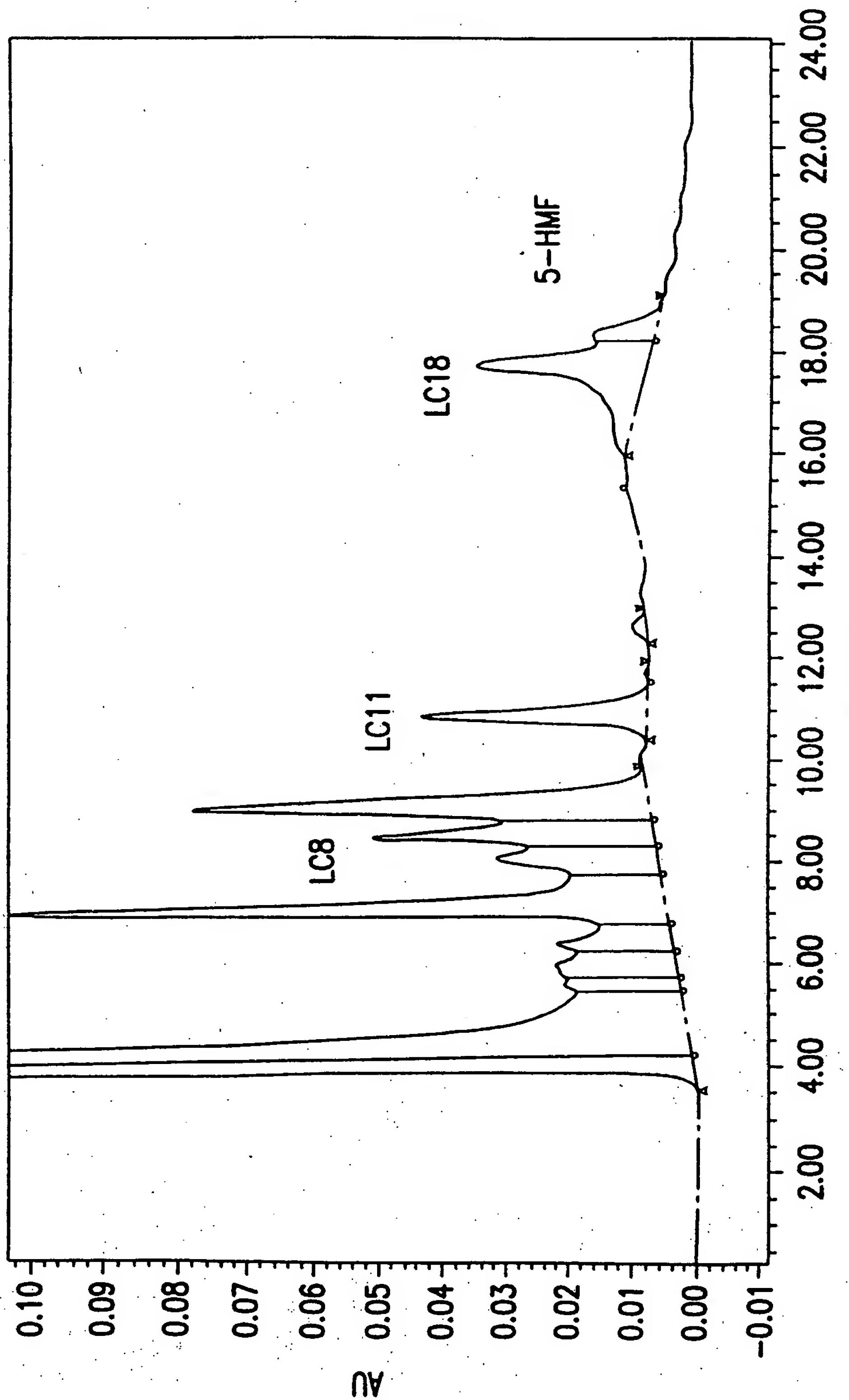


FIG. 2

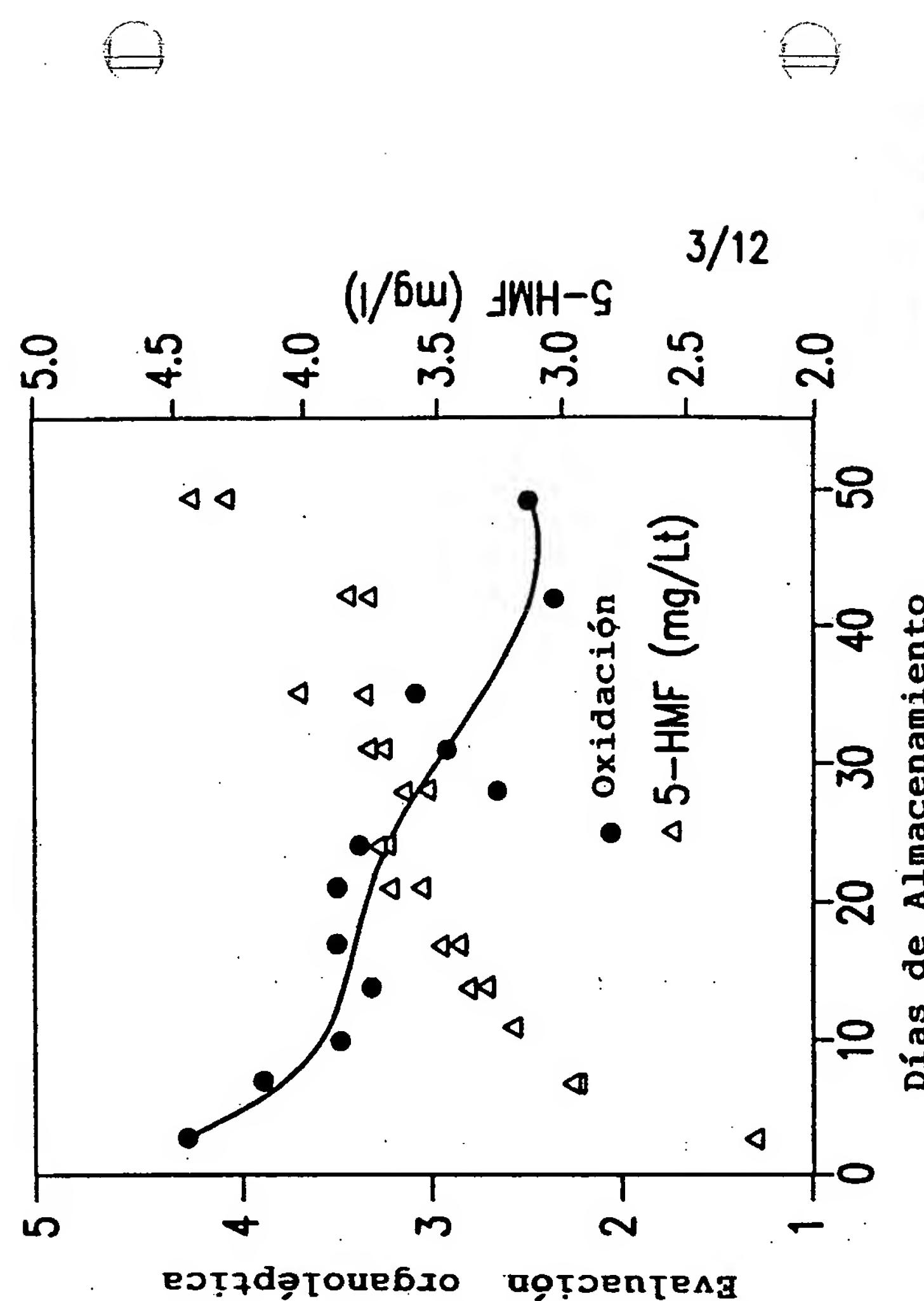


Fig. 3B

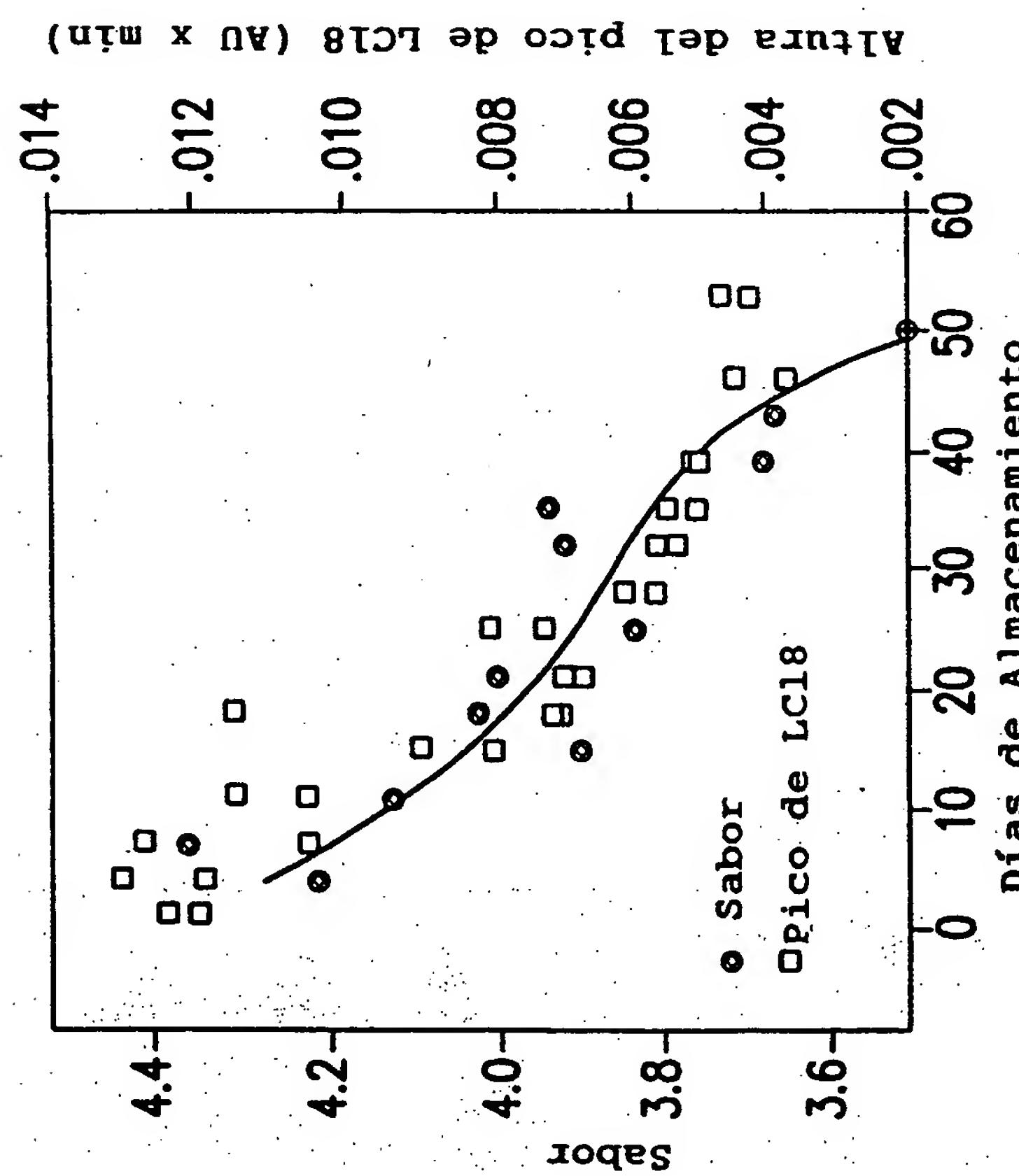
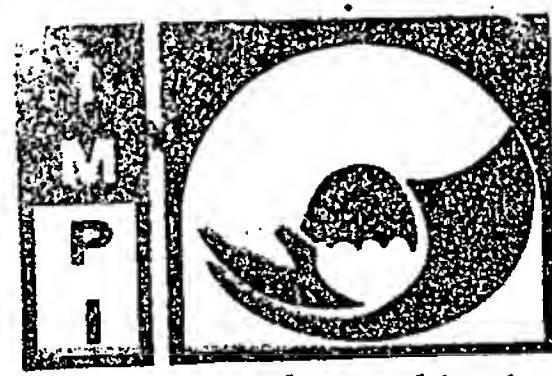
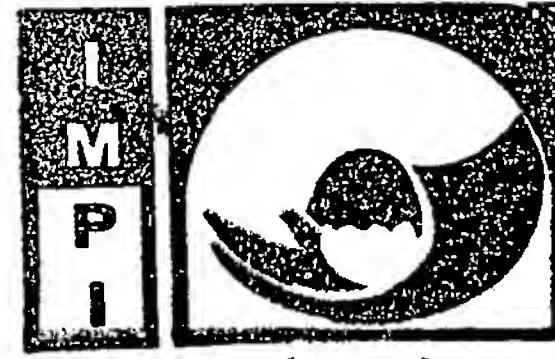


Fig. 3A



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

4/12



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

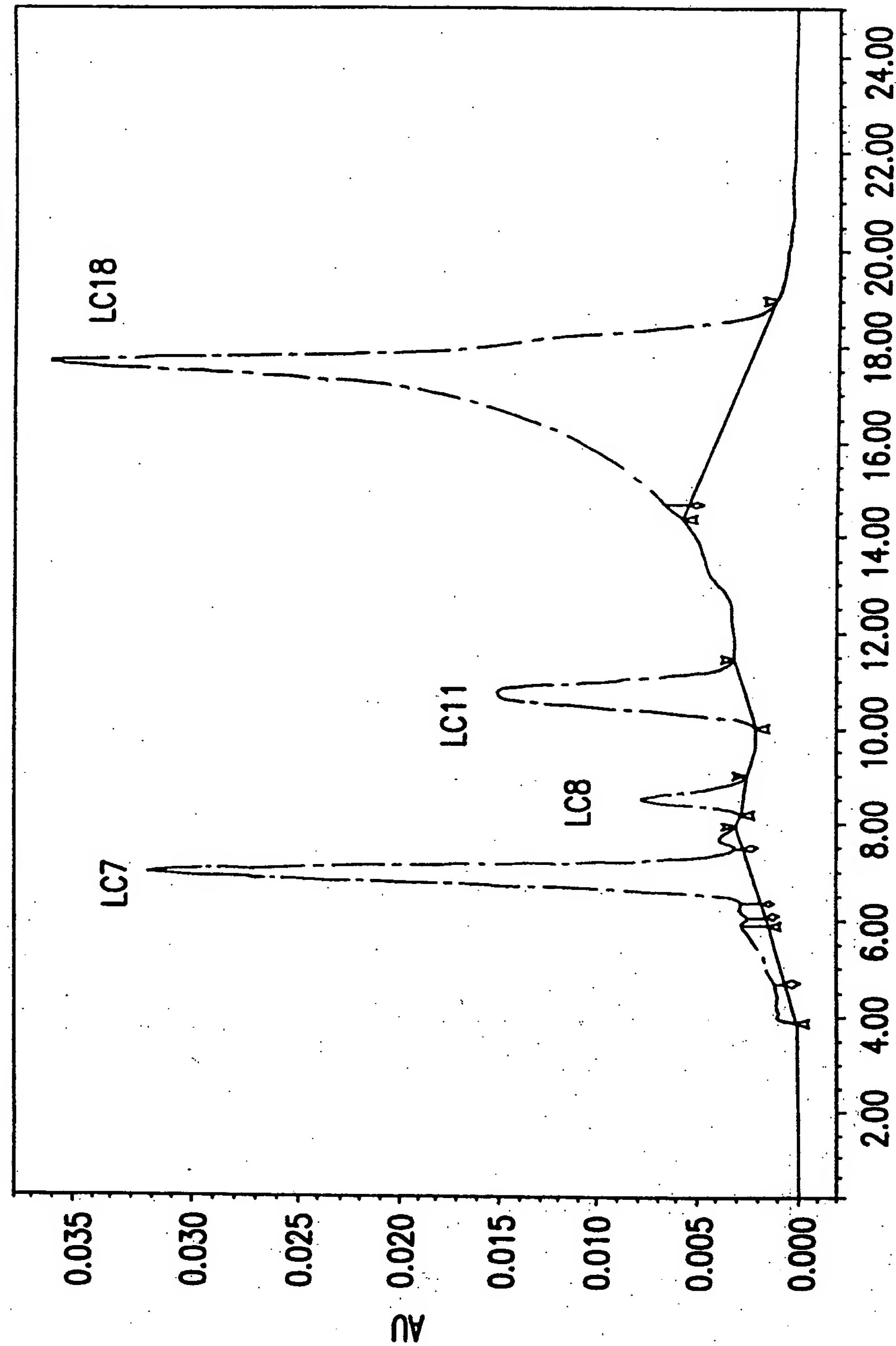
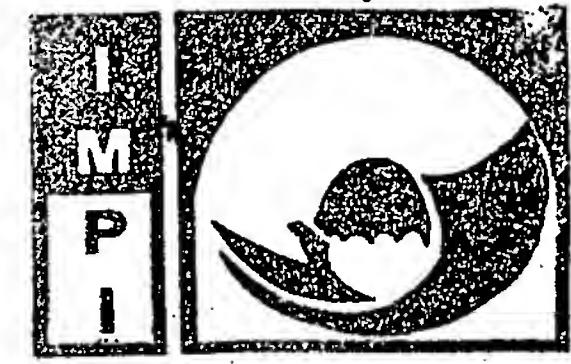


FIG. 4

5/12



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

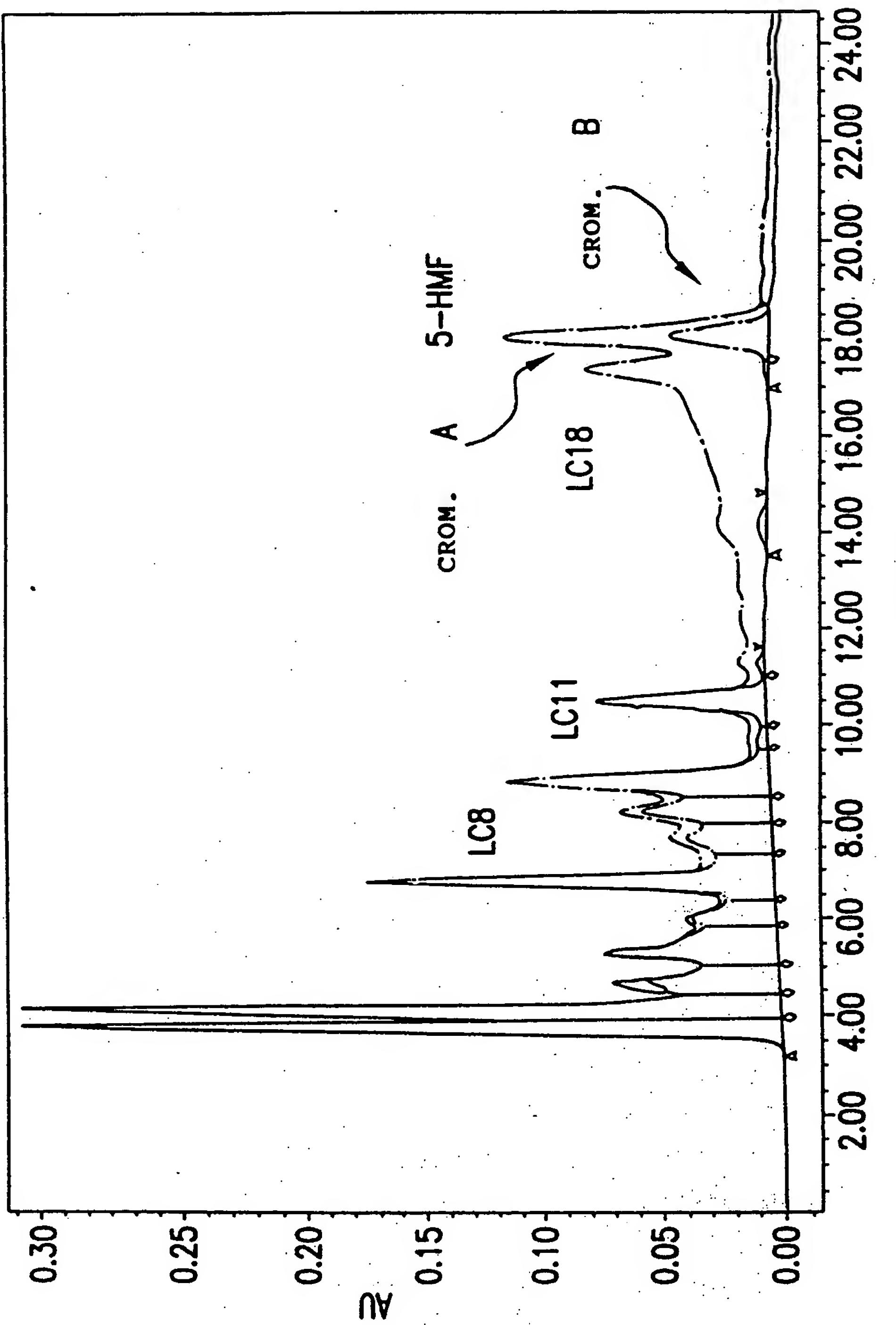
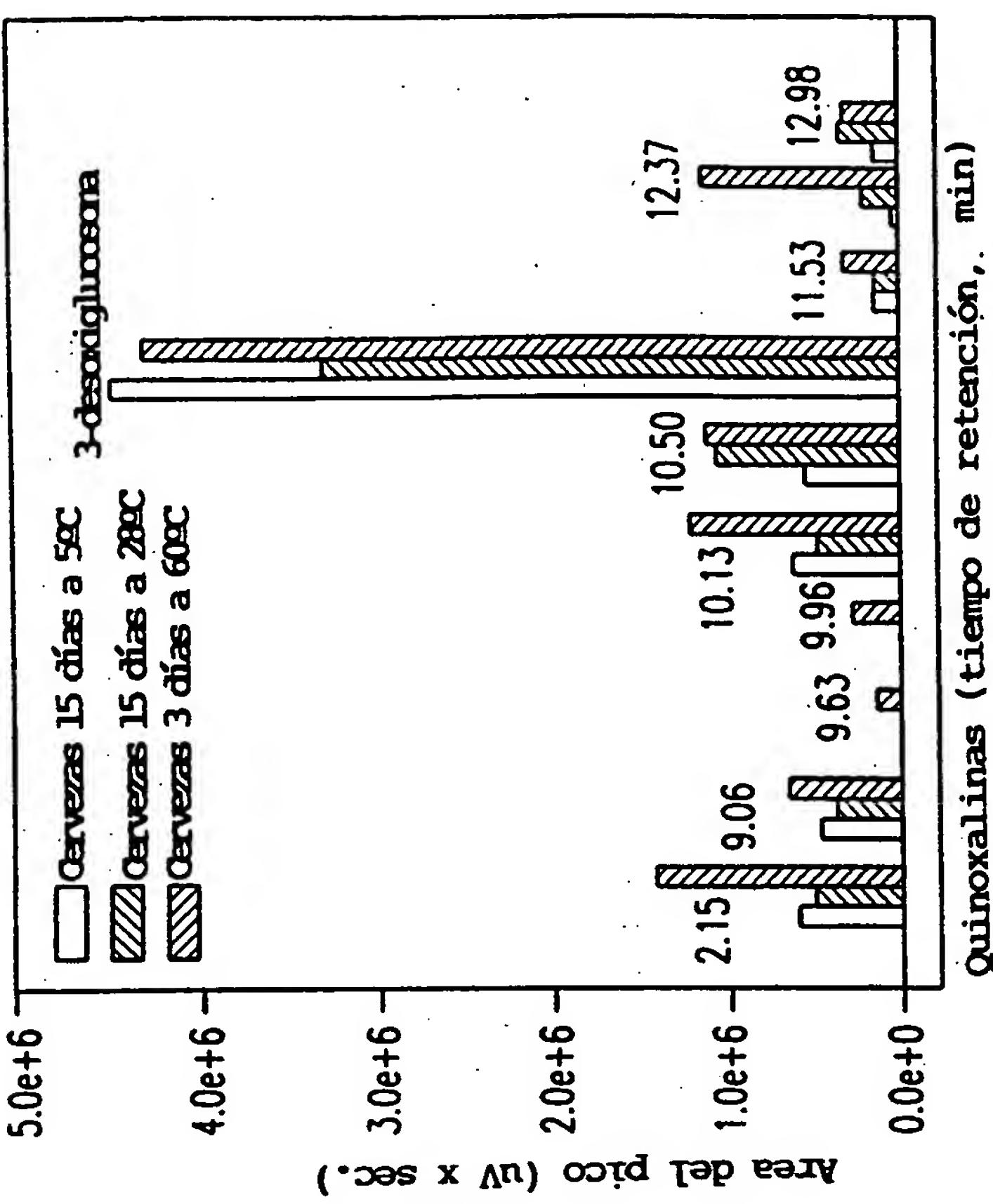
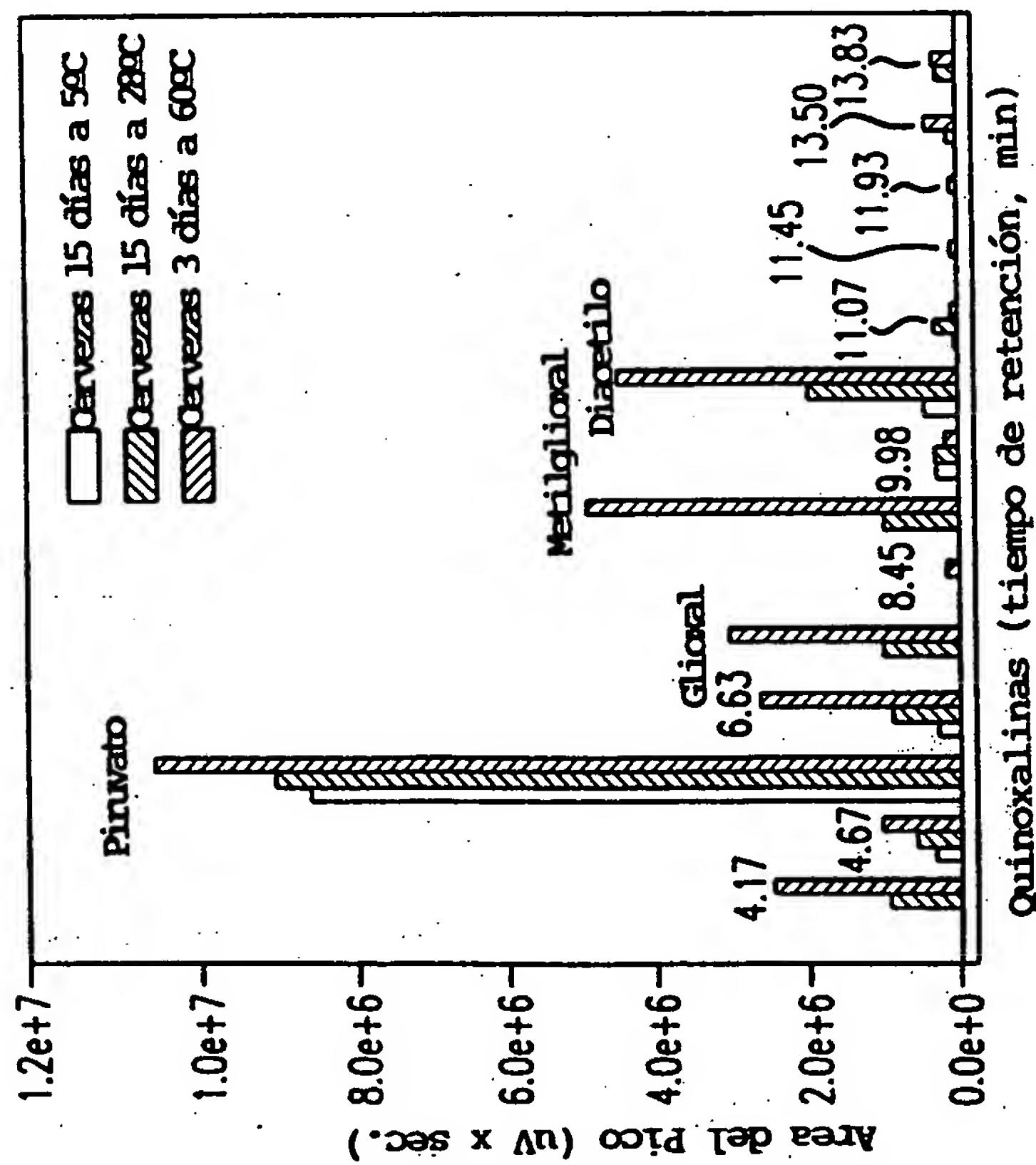
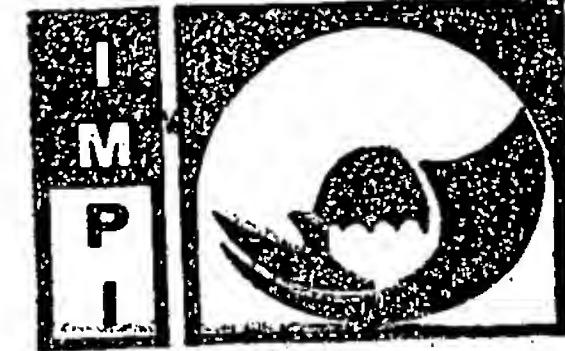


FIG. 5

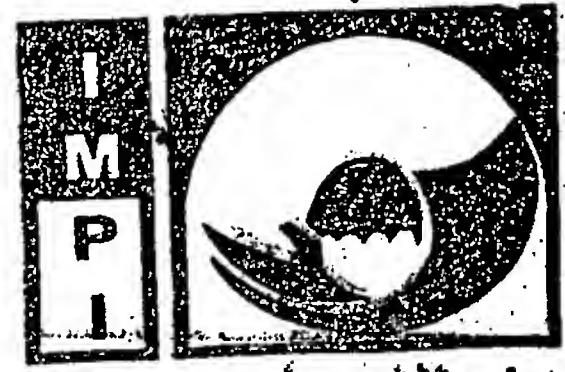


Lavado y rompimiento de las células de levadura

↓
Obtener la fracción citosólica↓
Cromatografía en columna DEAE-Sephadex
equilibrada con el amortiguador A↓
Recuperar DEAE 1 eluida con el
amortiguador A↓
Sulfato de amonio, 50-90% de saturación↓
Cromatografía en columna de CM Sephadex
equilibrada con el amortiguador B↓
Recuperar CM 1 eluida con el amortiguador B↓
Lavar y concentrar↓
Cromatografía en columna de Cibacron Blue
equilibrada con el amortiguador C↓
Recuperar Cibacron Blue 1 eluida con
KCl 400 mM en amortiguador C↓
Dializar y concentrar↓
Cromatografía en columna Red Sephadex
equilibrada con el amortiguador C↓
Recuperar Red Sephadex eluida con
KCl 500 mM en amortiguador C↓
Desalinizar y concentrar por ultrafiltración↓
Cromatografía de fase inversa
(columna Pro RPC)↓
Reductasa 1↓
Recuperar DEAE 2 eluida con KCl 250 mM
en el amortiguador A↓
Sulfato de amonio, 80% de saturación↓
Cromatografía en columna de CM Sephadex
equilibrada con el amortiguador B↓
Recuperar CM 2 eluida con el amortiguador B↓
Lavar y concentrar↓
Cromatografía en columna de Cibacron Blue
equilibrada con el amortiguador C↓
Recuperar Cibacron Blue 2 eluida con
KCl 0-1 M en amortiguador C↓
Cromatografía en columna Superosa 12
equilibrada con el amortiguador C↓
Recuperar Red Superosa 12↓
Concentrar↓
Cromatografía de fase inversa
(1 ml de la fuente RPC)↓
Reductasa 2

Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

8/12



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

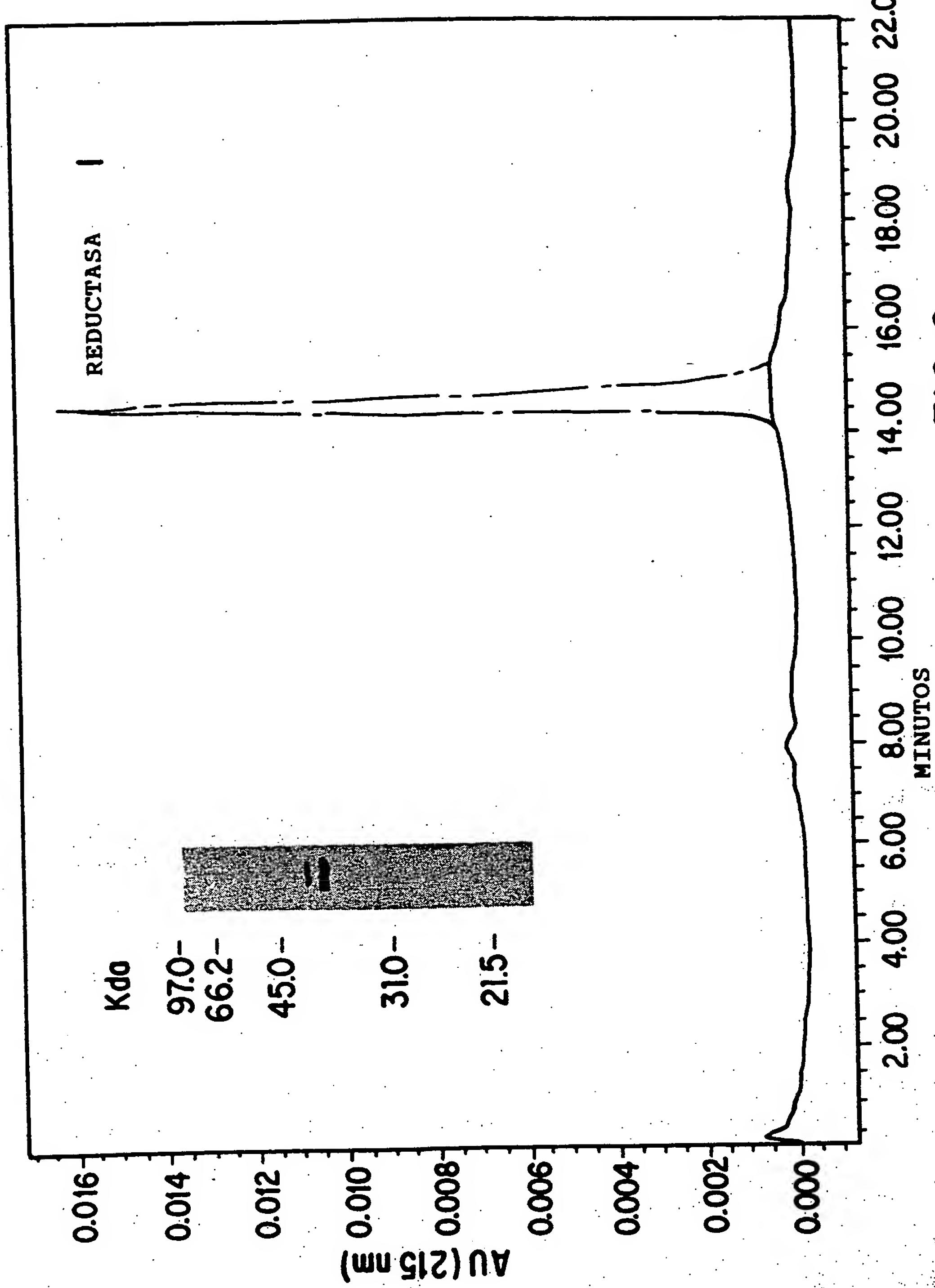
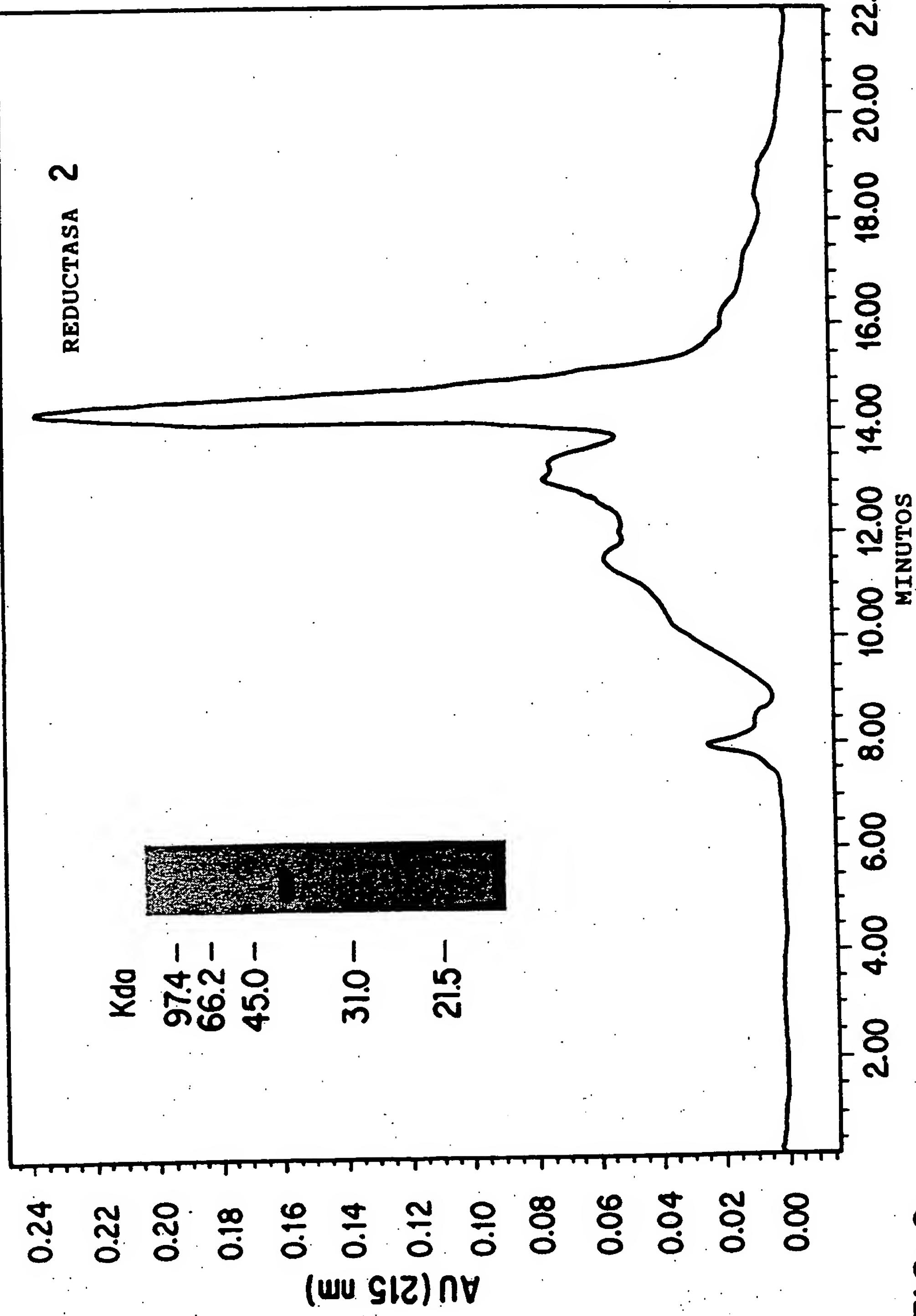
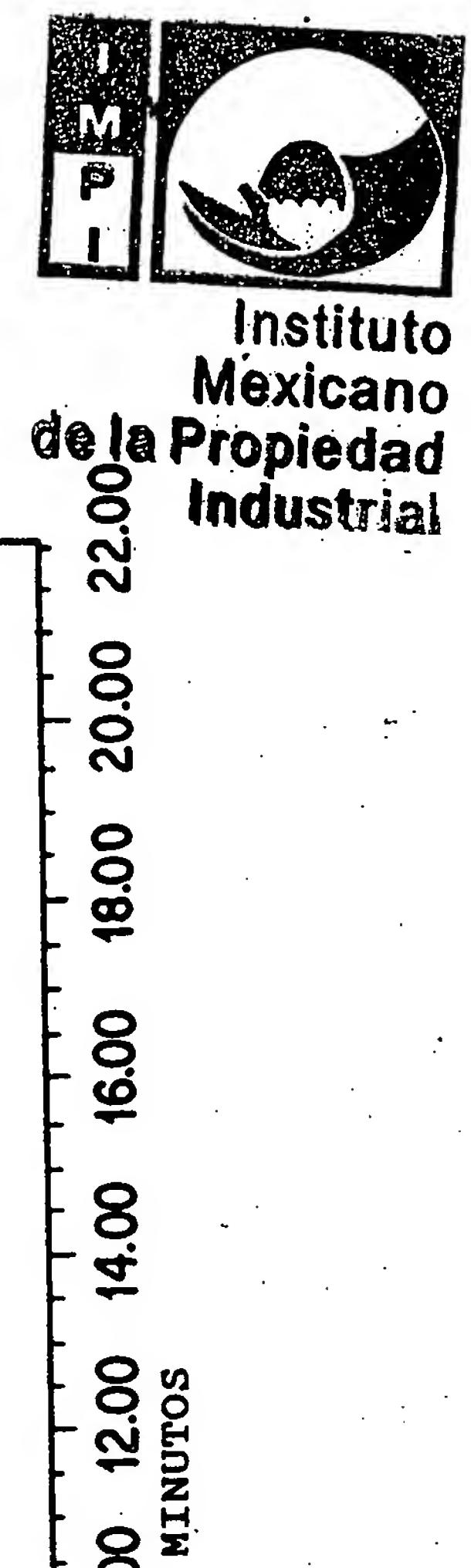


FIG. 8

9 / 12



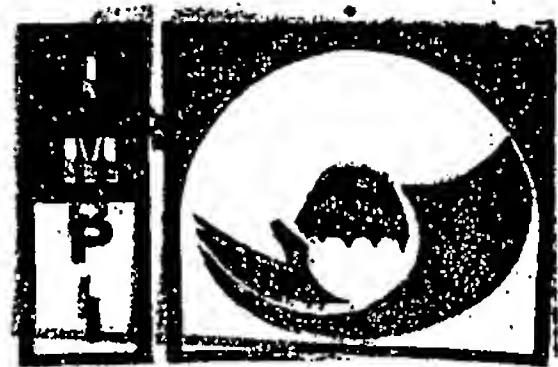
10/12



SUBSTRATO	ACTIVIDAD (nmol/min/mg)	
	REDUCTASA 1	REDUCTASA 2
PIRIDINA-3-ALDEHIDO	111.5	0.0
D- GLUCOURONATO	7.0	182.1
ACETALDEHIDO	585.8	41.9
METILGLIOXAL	331.6	230.3
D-GLUCOSA	23.1	0.0
D- GALACTOSA	12.1	0.0
D-XILOSA	34.2	0.0
METIRAPONA	329.6	383.0
2,3- BUTANODIONA	238.1	189.5
2,3- PENTANODIONA	20.1	0.0
3- DESOXIGLUCOSONA	190.9	115.1
PIRUVATO	9.0	0.0

FIG. 10

11/12



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

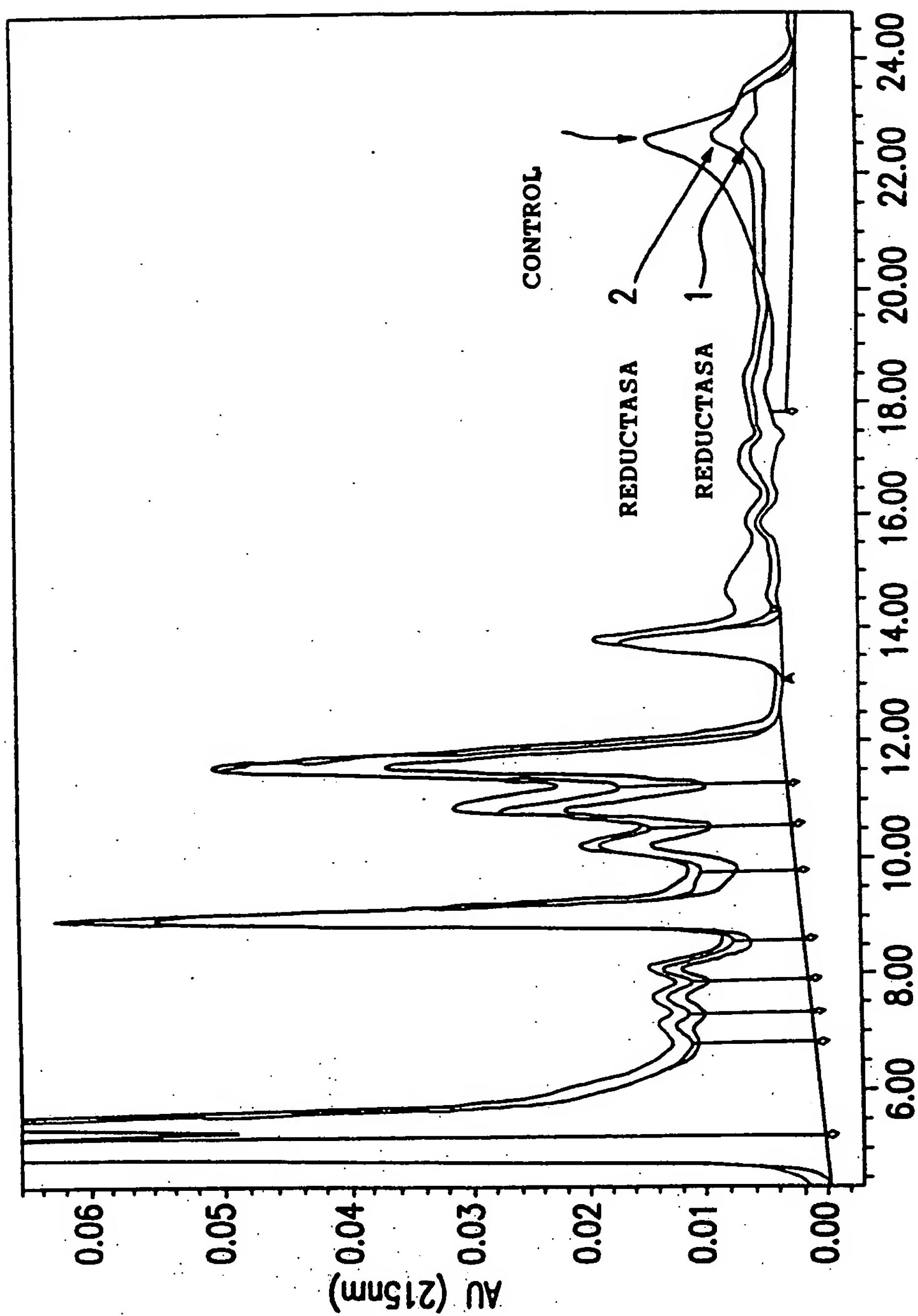


FIG. 11

12/12

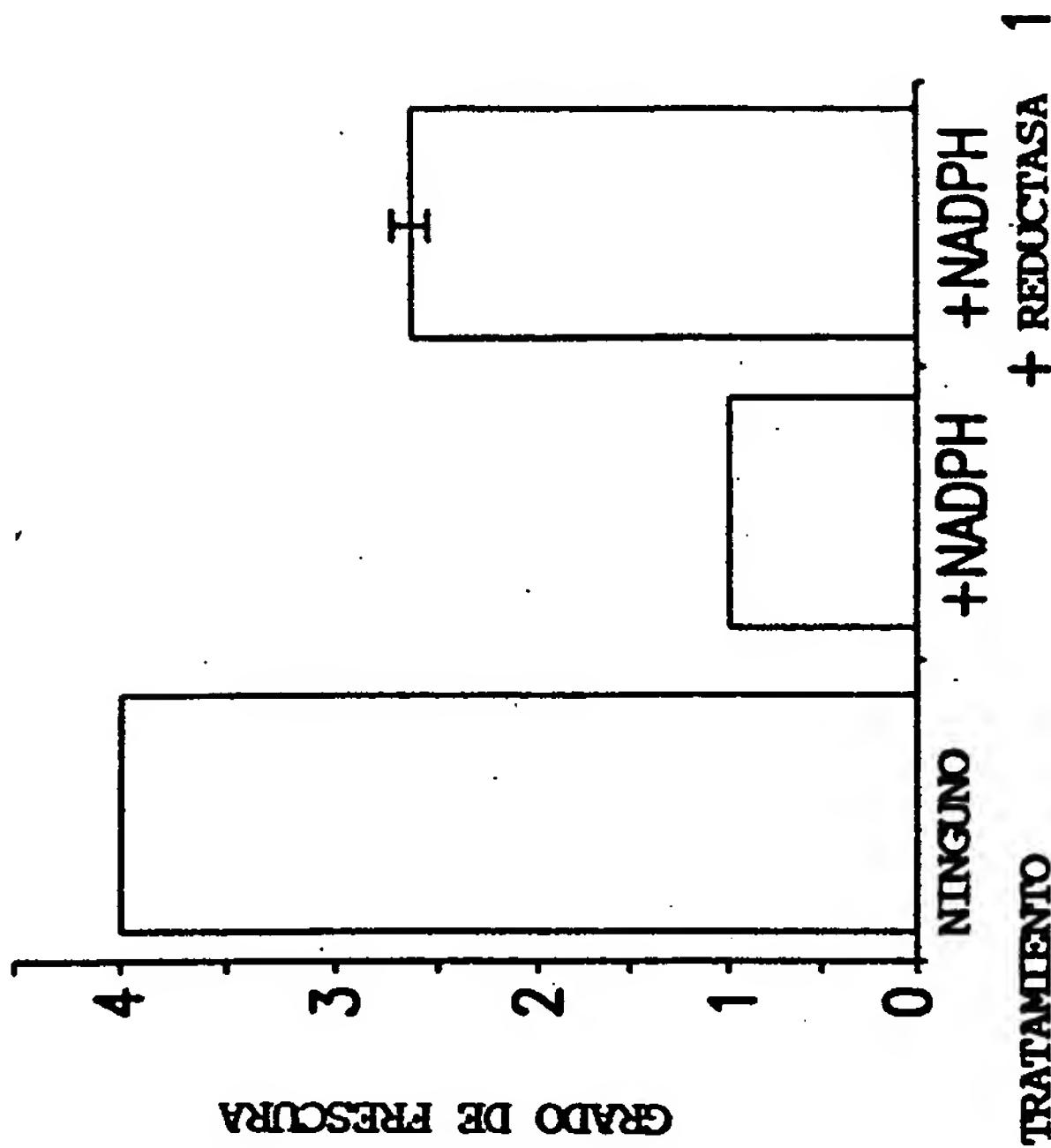


FIG. 12A

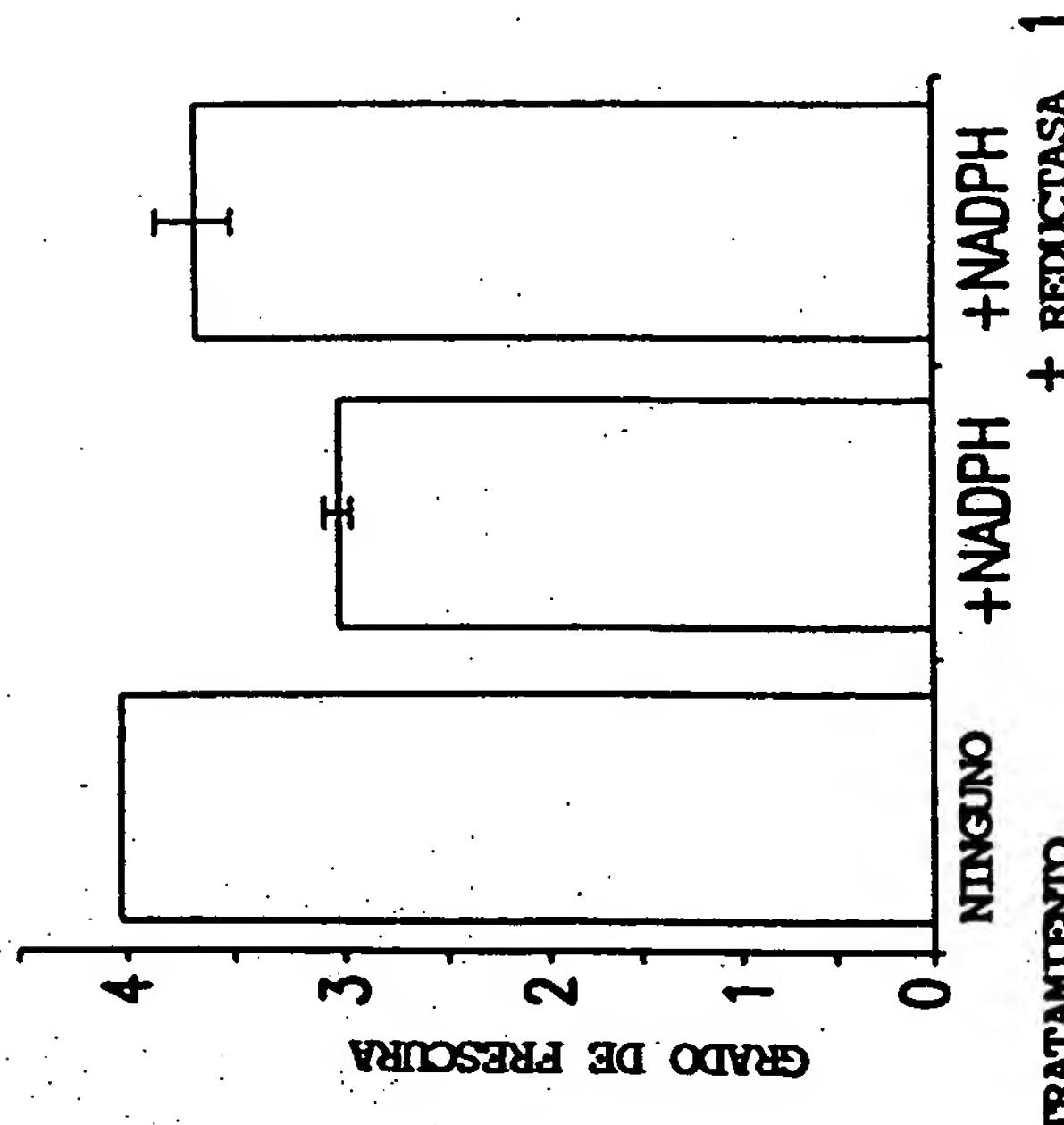


FIG. 12B



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.